N° d'enregistrement
au CNRS

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A l'Université Paris VI

par

Mr. HEALY Jean-Claude

pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences.

Sujet de thèse: Etude Expérimentale des associations réversibles entre les globules rouges

Date: 15 JUIN 1973

devant la Commission d'examen:

Mr D.DERVICHIAN Président
Mr.L.GOUGEROT
Mr.C.HOUILLON Examinateurs
Mr.M.JOLY

ETUDE EXPERIMENTALE DES ASSOCIATIONS REVERSIBLES ENTRE LES GLOBULES ROUGES

J.C HEALY

Laboratoire de Biophysique

C.H.U Pitié -Salpétrière Paris XIII

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

πάντα ῥεῖ

(Héraclite)

à Martine, Isabelle et François-Xavier, dont l'affection a soutenu ce travail que je suis heureux de leur offrir

à la mémoire de mon père

à ma mère et à tous les miens

à la mémoire de notre Maître regretté Mr. le Pr. A. DOGNON

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Membre de l'Académie de Médecine

qui m'a fait découvrir la Biophysique et a été directement l'initiateur de ces travaux.C'est un grand honneur et une grande joie pour un élève de pouvoir mener à bien un travail commencé sous la direction aussi perspicace que paternelle d'un tel Maître.

à Mr. le Pr. D.G. DERVICHIAN

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

qui a bien voulu s'intéresser à ce travail et me faire l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

à Mr. le Pr. L.GOUGEROT

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

dont l'enseignement permanent et polyvalent est pour moi une source continuelle d'émerveillement et de profonde reconnaissance

à Mr. le Pr. Ch. HOUILLON

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

que je remercie très vivement de témoigner de l'indispensable coopération entre les diverses disciplines fondamentales.

ăMr. le Dr.JOLY

Directeur de Recherches au C.N.R.S

dont les remarques et les conseils ont méticuleusement ponctué chacune des phases de ce travail et que je remercie profondément de sa bienveillante attention.

à Mr. le Pr.F.GREMY

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

En hommage respectueux

àMr. le Pr. G. MILHAUD

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

En témoignage de ma profonde reconnaissance

à tous mes maîtres de la Faculté des Sciences de Paris,de la Faculté de Médecine de l'I.N.S.T.N,de l'Institut G.ROUSSY,du Centre HAYEM,et des différents Hopitaux publics et privés de Paris.

à tous mes collègues et amis des Départements de Biophysique des CHU Pitié-Salpétrière et Saint Antoine.

à tous les étudiants

PLAN

INTRODUCTION

Intérêt théorique et pratique de la mesure des énergies d'interaction entre les cellules en général et entre les globules rouges en particulier.

Ière PARTIE

METHODE PHYSIQUE DE MESURE DES ENERGIES DE LIAISON INTERCELLULAIRE

Chapitre I:Matériel et méthode:

-Théorie de la rétrodiffusion de la lumière

-Montage expérimental employé

Chapitre II:Résultats

-Cinétiques d'agrégation des hématies

-Modifications de ces cinétiques par les agents pharmacodynamiques.

Chapitre III:Théorie de la cinétique de l'agrégation des globules rouges

-Mesure des énergies d'interaction interglobulaire.

Chapitre IV:Critique des Résultats.

-Autres méthodes de mesuee des énergies de liaison intercellulaire.

Chapitre V:Rappel des principales propriétés physicochimiques du globule rouge

Chapitre VI:Validité de la théorie de stabilité des colloides lyophobes pour les liaisons interglobulaires.

IIème PARTIE

CONSEQUENCES RHEOLOGIQUES DES LIAISONS INTERGLOBULAIRES REVERSIBLES

Chapitre I:Montage expérimental employé

ChapitreII:Résultats pour des sangs normaux et pour des sangs dissociés

Chapitre III:Interprétation des résultats.

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

Chez l'homme les capillaires sanguins constituent la partie fonctionnelle la plus importante de l'appareil circulatoire:c'est en effet à leur niveau que s'effectuent les échanges liquides et gazeux entre le sang et les cellules.
Cependant les lois de cet écoulement sont très mal connues ,et peu de techniques permettent de l'étudier sur le plan pratique.
On conçoit pourtant l'intérêt considérable qu'il y aurait de mieux explorer ces microcirculations,ne serait-ce que pour mettre en évidence certaines altérations dues aux parois(le contenant)ou dues au sang(le contenu).

Nous nous sommes ici intéressé au contenu,le sang,pour en définir les paramètres rhéologiques.Ces derniers sont eux-mêmes très mal connus,et sont susceptibles de varier dans de larges limites sous l'effet de modifications du plasma ou des cellules.Ainsi les propriétés rhéologiques du sang sont grandement influencées par l'état d'agrégation des globules rouges entre eux.
Cette agrégation est bien entendu une conséquence des propriétés des membranes globulaires,et traduit une énergie d'interaction.Nous retrouvons dès lors un autre problème fondamental en biologie:celui de la cohésion entre les cellules.Certaines cellules sont fortement liées les unes aux autres et constituent des organes solides.D'autres cellules comme les globules rouges sont également capables d'adhérer les unes aux autres mais avec des énergies beaucoup plus faibles,que la moindre agitation mécanique peut rompre.

Quelle est la grandeur de ces énergies de liaison intercellulaire et quel en est le sens physique?

Très peu de travaux expérimentaux ou théoriques ont été developpés sur cette question,surtout en France.
L'analogie de comportement avec les propriétés des suspensions colloidales permet pourtant d'approcher le phénomène.
C'est dans cet esprit que nous avons successivement mis au point une méthode physique de mesure des énergies de liaison intercellulaire,avant d'étudier les conséquences rhéologiques que ces associations peuvent avoir dans les capillaires.
Les adsorptions de macromolécules circulantes sur les membranesglobulaires, en modifiant les énergies d'interaction,sont ainsi ,indépendemment de leurs autres effets,capables de modifier les conditions microcirculatoires:c'est peut-être une explication de certaines modifications hémodynamiques brutales survenant parfois en clinique.

Ière PARTIE

METHODE PHYSIQUE DE MESURE DES ENERGIES DE LIAISON INTERCELLULAIRE

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODE

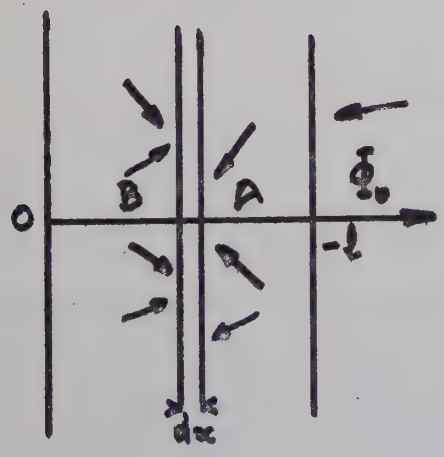
Aucune des quelques techniques de mesure des énergies de liaison intercellulaire qui ont été décrites n'est pleinement satisfaisante.Nous en ferons ultérieurement une étude critique (Chapitre 4).

Par contre il a été démontré que l'on pouvait connaître les liaisons inter macromoléculaires ou interparticulaires à partir de leur cinétique d'agrégation.(I,I2,I3,I4,I5,I6).

Or on peut expérimentalement suivre les cinétiques d'agrégation cellulaire par une méthode optique,basée sur les propriétés de réflexion diffuse de la lumière par les grosses particules en suspension(2,3,7,8;9) Nous rappelerons ici cette théorie que nous utiliserons largement par la suite.

A)Rappel de la théorie de la rétrodiffusion de la lumière par les grosses particules en suspension.

Les propriétés optiques des colloides ont fait l'objet d'innombrables travaux aux quels se rattachent les noms de Lord Rayleigh,Oster,Mie (4,5,6,24).Les équations de diffusion deviennent rapidement assez compliquées pour de petites particules.
Par contre,quand de grosses particules douées d'absorption sélective,sont éclairées en lumière visible,des simplifications ont été proposées à partir de l'emploi de l'optique géométrique.
Plusieurs auteurs(2,5,6,7,8) ont proposé le raisonnement suivant ,valable quand le diamètre des particules est beaucoup plus grand que la longueur d'onde incidente.



Soit une couche élémentaire de milieu trouble éclairé
dx=épaisseur infiniment petite du milieu trouble.
A=flux atteignant cette couche de droite à gauche(axes orienté de G à D=+)
B=flux atteignant cette couche de gauche à droite
k=coefficient d'absorption des particules en susppnsion pour la longueur d'onde incidente
μ =coefficient d'absorption équivalent du milieu trouble.

$\mu = k \dfrac{\text{volume particulaire}}{\text{volume total}}$

c'est le coefficient d'absorption qui caractériserait une solution dans laquelle le pigment serait réparti de façon homogène

k' = coefficient de diffusion que présenterait un milieu diffusant constitué par des particules identiques à celles du milieu, mais dépourvues de pigment.

Les variations de flux sont données par

$$\frac{dA}{dx} = -\mu A + \frac{I}{2} k'(B-A)$$

$$\frac{dB}{dx} = +\mu B + \frac{I}{2} k'(B-A)$$

en supposant que la diffusion est symétrique par rapport au plan dx, vue la taille des particules vis à vis de la longueur d'onde. (IOI)

On peut donc écrire:

$$\frac{d(A+B)}{dx} = (\mu + k')(B-A)$$

$$\frac{d(A-B)}{dx} = -k'(A+B)$$

D'où par différentiation:

$$\frac{d^2(A+B)}{dx^2} = \mu(\mu + k')(A+B)$$

Soit par intégration:

$$A + B = K_I e^{\sqrt{\mu(\mu+k')}\,x} + K_2 e^{-\sqrt{\mu(\mu+k')}\,x}$$

A et B étant le flux total diffusé en avant et en arrière

En posant comme condition aux limites: B=0 pour x=0,

A= Φ_0 pour x=-l (face antérieure de la cuve)

il vient:

$$K_I = \frac{-2\left(1-\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)\Phi_0}{\left(1+\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)^2 e^{\left[(\mu+k')\right]^{\frac{1}{2}}x} - \left(1-\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)^2 e^{-\left[\mu(\mu+k')\right]^{\frac{1}{2}}x}}$$

$$K2 = \frac{2\left(1+\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)\Phi_0}{\left(1+\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)^2 e^{\left[(\mu+k')\right]^{\frac{1}{2}}x} - \left(1-\sqrt{\frac{\mu}{\mu+k'}}\right)^2 e^{-\left[\mu(\mu+k')\right]^{\frac{1}{2}}x}}$$

Pour x=0, on A= flux transmis et on a :

$$\frac{\Phi_0}{\Phi_t} = Ch\, l\sqrt{\mu(\mu+k')} + \frac{2\mu+k'}{2\sqrt{\mu(\mu+k')}}\, Sh\, l\sqrt{\mu(\mu+k')}$$

Quand l'absorption est nulle, on a la relation de Langevin

$$\frac{\Phi_0}{\Phi_t} = 1 + h'\frac{l}{2}$$

- On peut étendre ce raisonnement au flux rétrodiffusé (5,6):

Cette extension donne, en posant $(B)_{x=-1}$ = Flux rétrodiffusé Φ_r

$$\Phi_r = \frac{\left(1-\sqrt{\frac{\mu}{\mu+h'}}\right)^2 \Phi_0 \left[e^{-(\mu+h')\frac{\mu}{(\mu+h')}l} - e^{\sqrt{\mu(\mu+h')}\,l}\right]}{\left(1+\sqrt{\frac{\mu}{\mu+h'}}\right)^2 e^{\sqrt{\mu(\mu+h')}\,l} - \left(1-\sqrt{\frac{\mu}{\mu+h'}}\right)^2 e^{-\sqrt{\mu(\mu+h')}\,l}}$$

Le rapport, flux rétrodiffusé sur flux transmis est donc

$$\frac{\Phi_r}{\Phi_t} = -\frac{1}{2}\frac{h'}{\sqrt{\mu(\mu+h')}}\,Sh\,l\sqrt{\mu(\mu+h')}$$

Ce rapport est bien indépendant du flux incident.

-Le rapport flux rétrodiffusé sur flux incident est également indépendant de l'épaisseur l de la cuve, à partir d'une épaisseur minimum l_0 suffisamment grande pour que

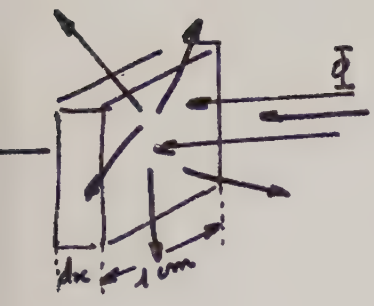
$$Ch\,l_0 \equiv Sh\,l_0$$

En effet

$$\frac{\Phi_r}{\Phi_0} = \frac{1}{2}\,\frac{\frac{h'}{\sqrt{\mu(\mu+h')}}\,Sh\,l\sqrt{\mu(\mu+h')}}{\frac{2\mu+h'}{2\sqrt{\mu(\mu+h')}}\,Sh\,l\sqrt{\mu(\mu+h')} + Ch\,l\sqrt{\mu(\mu+h')}}$$

d'où $l > l_0$, $\quad \frac{\Phi_r}{\Phi_0} = \frac{h'}{2\mu+h'+2\sqrt{\mu(\mu+h')}}$

-Rôle de la concentration: quand le diamètre des particules en suspension est grand par rapport à λ, les équations de diffusion peuvent être obtenues à partir de l'optique géométrique:



Soit un élément de volume dV, d'épaisseur dx, dont les faces sont parallèles à celles de la cuve, et de section
Soit N=Nombre de particules par unité de volume. L'élément dV contient donc N.dx.

Φ_0 =flux incident , Φ_r =flux rétrodiffusé.

$\bar{\sigma_i}$ =section efficace moyenne d'une particule

$\bar{\sigma}$ =section efficace de l'ensemble des particules contenues dans $dV = N\,dx\,\bar{\sigma_i}$

On peut écrire:

$$\Phi_r = R' \Phi_0 N \bar{\sigma_i} dx$$

avec R'=coefficient de diffusion apparent d'une particule pour un flux incident parallèle. Si le flux est parfaitement diffusé, ce n'est plus l'aire apparente des particules qui intervient, mais l'aire effective, avec un coefficient de diffusion R

$$\text{d'où: } k' = R N \sigma_i$$

Enfin, si $\mu = \frac{\text{V. Particulaire}}{\text{V. Total}} \times k$, et si $\mu = k N v_i$

avec v_i=volume d'une particule, on peut écrire:

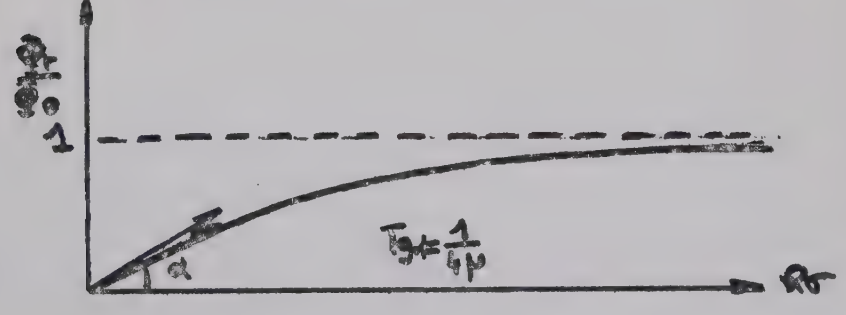
$$\frac{\Phi_r}{\Phi_0} = \frac{N R \sigma_i}{2 k N v_i + N R \sigma_i + 2N\sqrt{k v_i (k v_i + R\sigma_i)}}$$

ce rapport est bien indépendant de N.

- Rôle de l'agrégation particulaire:

Avec les notations précédentes, on peut exprimer $\frac{\Phi_r}{\Phi_0}$ en fonction de $R\sigma$ (σ=aire effective totale des particules)

Avec $\lim \frac{\Phi_r}{\Phi_0}$ pour $R\sigma \to 0$ égale 0 et $\lim \frac{\Phi_r}{\Phi_0}$ pour $R\sigma \to \infty$ égale 1 l'allure du graphe est le suivant:



Par dérivation, on tire $R\sigma = 4kN\nu_i \dfrac{\Phi_r/\Phi_0}{1-(\Phi_r/\Phi_0)^2}$

et on peut en déduire :

(1) $$\frac{\sigma'}{\sigma} = \frac{\Phi_r'}{\Phi_r} \cdot \left[\frac{\Phi_0 - \Phi_r}{\Phi_0 - \Phi_r'}\right]^2$$

avec σ' = aire des agrégats après agrégation

σ = aire des particules dissociées

Φ_r = flux rétrodiffusé avant agrégation

Φ_r' = flux diffusé après agrégation

Φ_0 = flux incident

Cette relation fondamentale est indépendante de la concentration ou de l'épaisseur de la cuve de mesure tant que le flux transmis peut être considéré comme nul.

Ainsi, à partir d'un état complètement dissocié, on peut suivre la granulométrie d'une suspension en étudiant au cours du temps le pouvoir réflecteur.

Nous avons appliqué ce phénomène à l'étude de la granulométrie sanguine en employant le montage et le protocole décrit ci après.

B Montage et protocole utilisés.

Les premiers auteurs ayant exploité les propriétés de rétrodiffusion de la suspension sanguine(7,8,9) mesuraient directement ce flux par une cellule photoélectrique.

Le montage en opposition que nous avons utilisé permet un accroissement considérable de la sensibilité,sans avoir besoin de recourir à un photomultiplicateur.(3,IO)

Ce montage est figuré ci-contre(figure I).

L'image d'une source stabilisée S,à filament ramassé,se forme sur la couche antérieure du sang à examiner,contenu dans une petite en verre de 5mm d'épaisseur environ.

Sur le trajet du faisceau sont interposés:

-un filtre Wratten,ne laissant passer que le rouge($\lambda > 625 m\mu$)

—des lentilles , et un filtrede densité optique connue.

-un diaphragme de réglage.

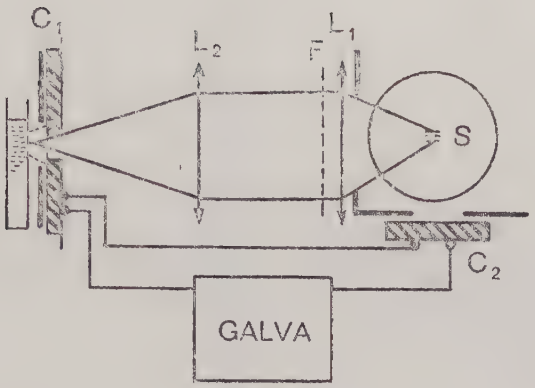
Le faisceau convergent tombe sur la cuve en passant à travers un petit orifice de I mm environ percé dans une cellule photoélectrique à couche d'arrêt C_1 ,dont la face sensible est tournée vers la cuve.

Une seconde cellule C_2, montée en opposition avec la première,reçoit un flux lumineux réglable ,issu de la même source.

Le courant résultant est envoyé sur un galvanomètre enregistreurà suiveur de spot.

Ce montage différentiel permet d'étudier facilement l'accroissement du pouvoir réflecteur du sang qui accompagne le passage de l'état normal àl'état dissocié obtenu par simple agitation mécanique du sang dans la cuve de verre.Il est également possible de mesurer la valeur absolue du flux rétrodiffusé en interposant par exemple à la place de la cuve des filtres étalons de pouvoir réflecteur connu. (Figure2).A l'aide de ces étalons(Kodak),donnant une fraction variable du flux incident,on peut étaloner l'appareillage et vérifier la linéarité de la réponse de la cellule dans la gamme des flux considérés.La figure 3 montre l'intensité enregistrée pour des filtres de pouvoir réflecteur croissant:la réponse est bien linéaire,au delà de 4% du flux rétrodiffusé.

REFLECTOMETRE DE DOGNON



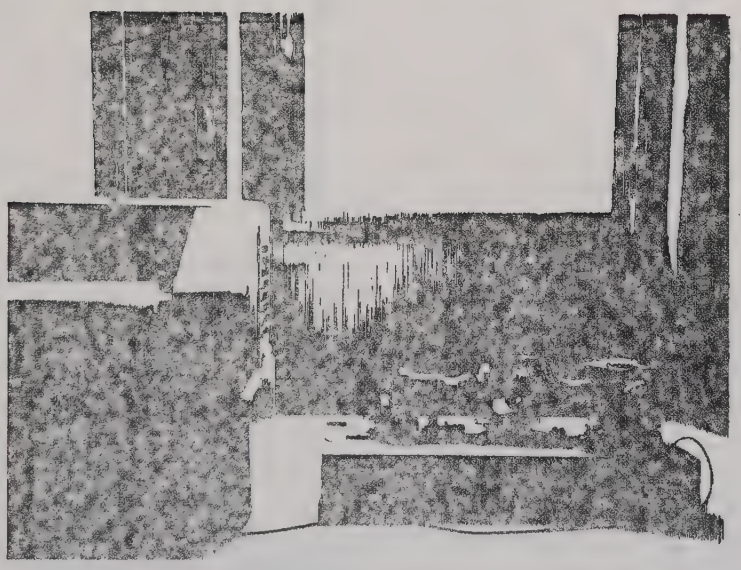
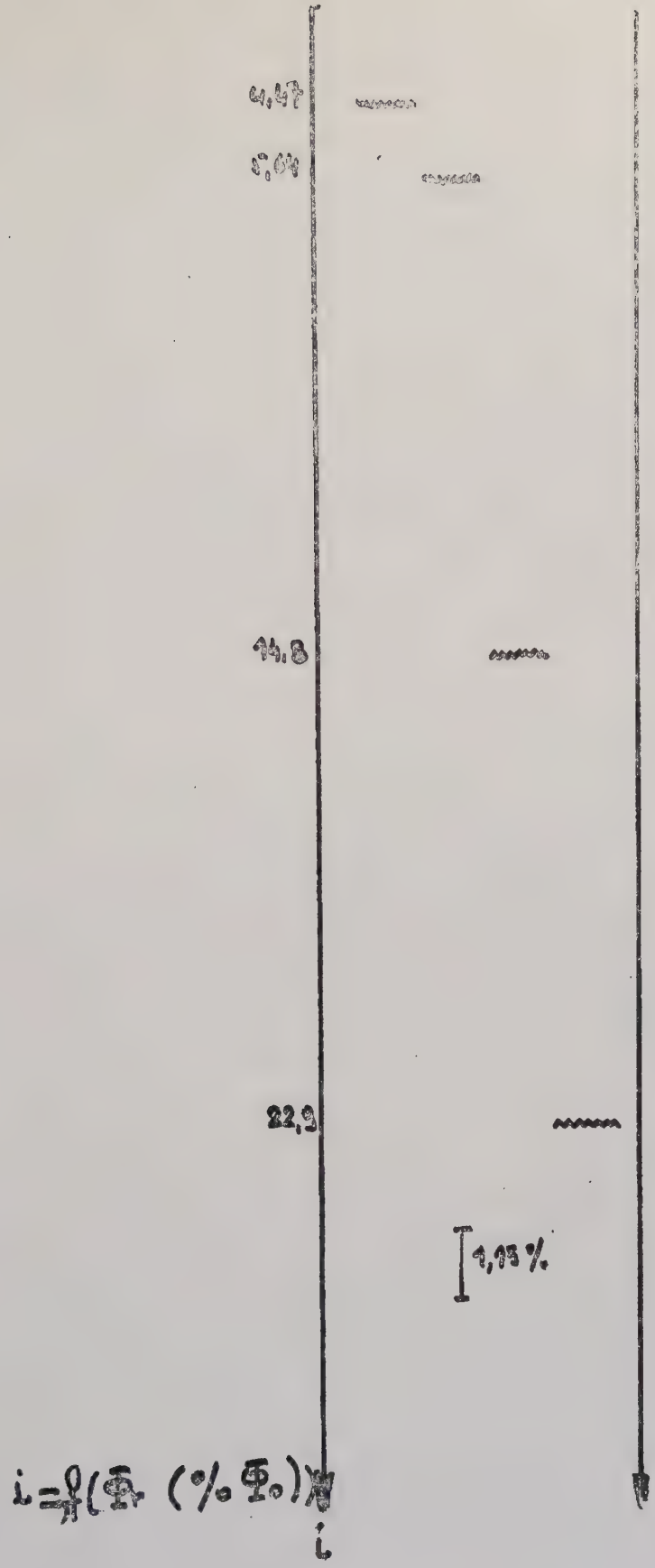


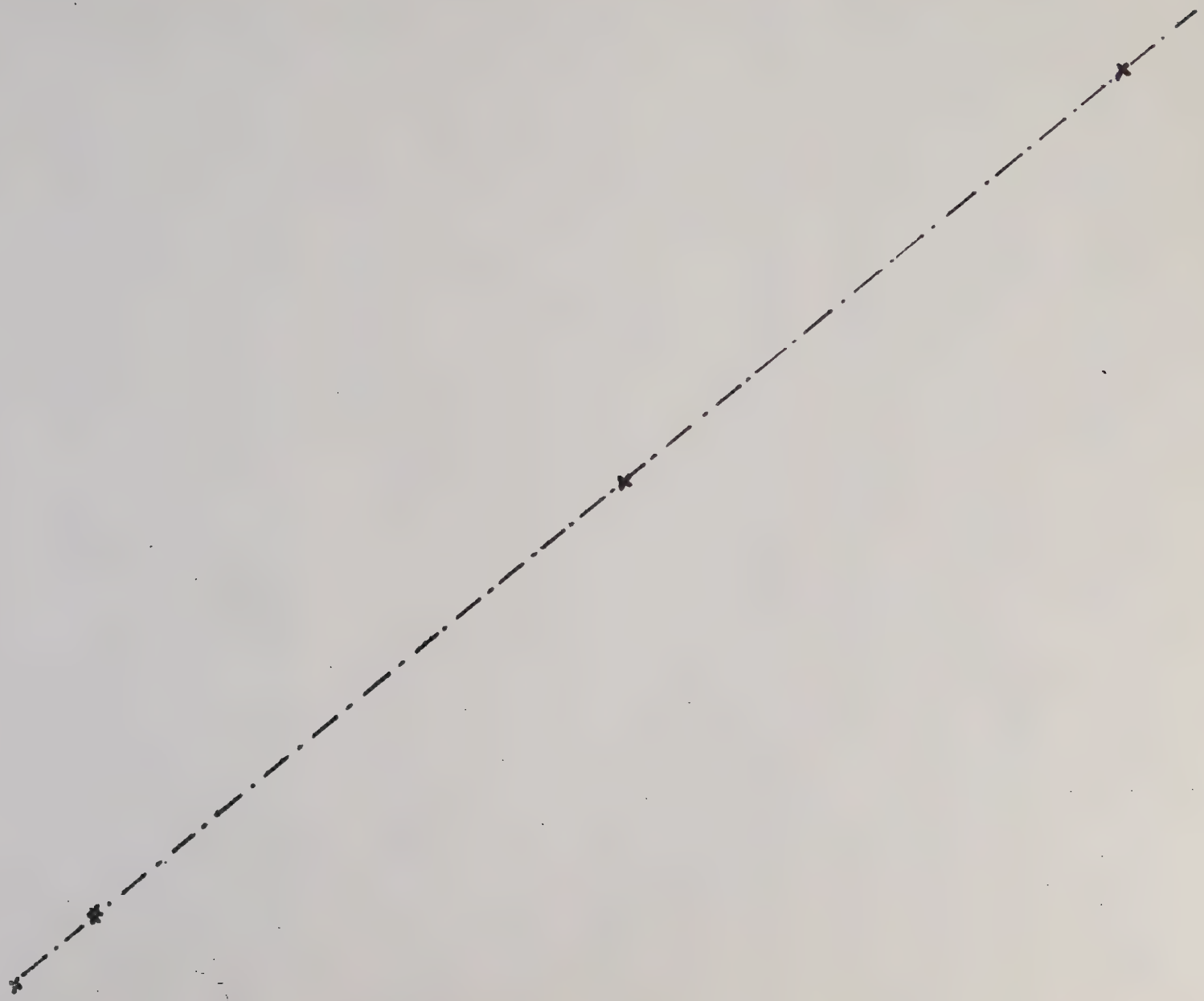
FIG. I



Etalons de P.R connu.

Fig. 2.

Fig 3 - $i = f(\Phi_r)$



Les manipulations se font dans l'obscurité et comportent trois modalités particulières dont chacune s'adapte à un but défini. (3,8,I0)

I)Dans la première technique que nous utilisons habituellement,le sang est placé dans la cuve en verre de 2cc environ.L'agitation est réalisée à l'aide d'un agitateur de verre.Cette agitation est largement suffisante pour rompre les rouleaux d'hématies formés,mais ne peut être quantifiée .Les cinétiques de recombinaison sont par contre très facilement suivies après arrêt de l'agitation.

2)Dans la seconde technique,la cuve à face parallèle est remplcée par une cuve cylindrique de 24 mm de diamètre,dans laquelle plonge un cylindre coaxial de 20mm de diamètre,laissant un espace annulaire de 2mm.Cet espace est rempli de sang.En imprimant au cylindre central un mouvement de rotation uniforme ,on applique au sang des contraintes qui dissocient les liaisons éventuellement formées. A chaque vitesse de rotation correspand un certain état d'équilibre dynamique, jusqu'à dissociation totale pour une certaine vitesse limite.
Le phénomène est d'une grande sensibilité:le pouvoir réflecteur enregistré dans ces conditions augmente pour des taux de cisaillement inférieurs à I0 sec^{-I} .
Le pouvoir réflecteur cesse de croître au delà de 50 sec^{-I},valeur en bon accord avec celles données par plusieurs auteurs comme capables de dissocier complètement les rouleaux formés(II;4I;47).

3)Une troisième technique que nous n'avons pas développée consiste à placer le sang dans un tube capillaire:le pouvoir réflecteur est alors minimum au repos et s'élève dès que l'écoulement est assuré.Ces techniques sont à rapprocher des études de rhéoturbidimétrie.(I2,I3,I4,I5,I6).Elles sont capables des mêmes applications et entre autres de mesurer les interactions dynamiques pouvant exister entre les particules d'une suspension soumise à un écoulement.

Seule la première de ces techniques a été largement utilisée car elle se prête bien à l'étude des cinétiques .
Le sang(I,5 cc environ),prélevé le matin sur anticoagulant(citrate le plus souvent) est préalablement oxygéné pour assurer une teneur constante en $Hb.O_2$.Cet échantillon est placé dans la cuve de mesure.Cette agitation suffit à dissocier les globules les uns des autres.Après un repos de cinq minutes environ,un pouvoir

réflecteur stable est de nouveau obtenu,correspondant à un certain état d'agrégation.

Sans modifier cet état,on lève transitoirement un filtre de densité optique connue sur le trajat du faisceau incident:on enregistre ainsi une variation connue ,fixe du pouvoir réflecteur qui permet de juger de la valeur de l'augmentation que l'on obtiendra par agitation.Compte tenu du flux spéculairement réfléchi par la face antérieure en verre de la cuve,cette variation ne permet que de donner un index de la variation du pouvoir réflecteur,qui suffit pour des mesures comparatives.Les valeurs absolues peuvent être mesurées à l'aide d'écrans étalons placés à la place de la cuve.

A partir de l'état de base,on assure la dissociation totale des rouleaux formés à l'aide d'une pipette plongée dans la cuve.Il s'en suit une importante augmentation du pouvoir réflecteur,correspondant à une augmentation des surfaces réfléchissantes.Cette variation est enregistrée.L'agitation étant imterrompue,on enregistre la décroissance progressive du flux rétrodiffusé avec la recombinaison des rouleaux.L'état d'équilibre est à nouveau atteint en moins de 5 minutes pour un sang normal.

Cet équilibre est entièrement réversible et une nouvelle agitation à partir de ce niveau donne le même graphe.(figures 4,7,8)

Cette technique de routine a été utilisée avec de nombreux sangs normaux et pathologiques,ainsi que pour mettre en évidence l'action des agents pharmacodynamiques sur l'agrégation des globules rouges.

Les résultats sont consignés dans le chapitre 2.

Sang Nal.

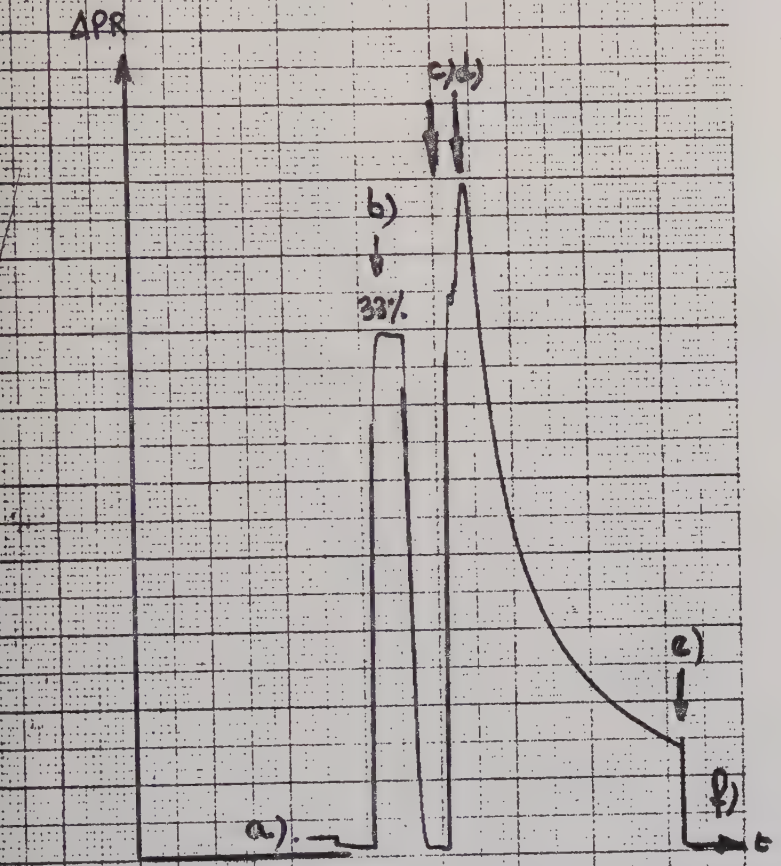


Fig 4.

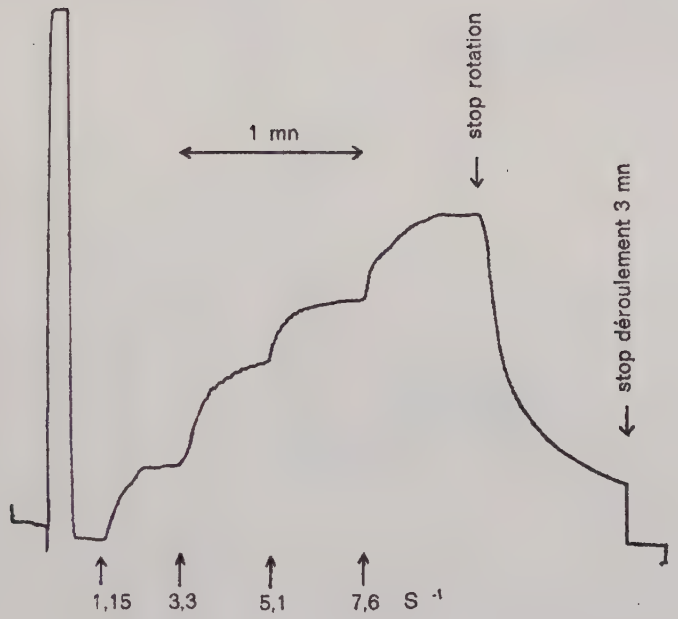
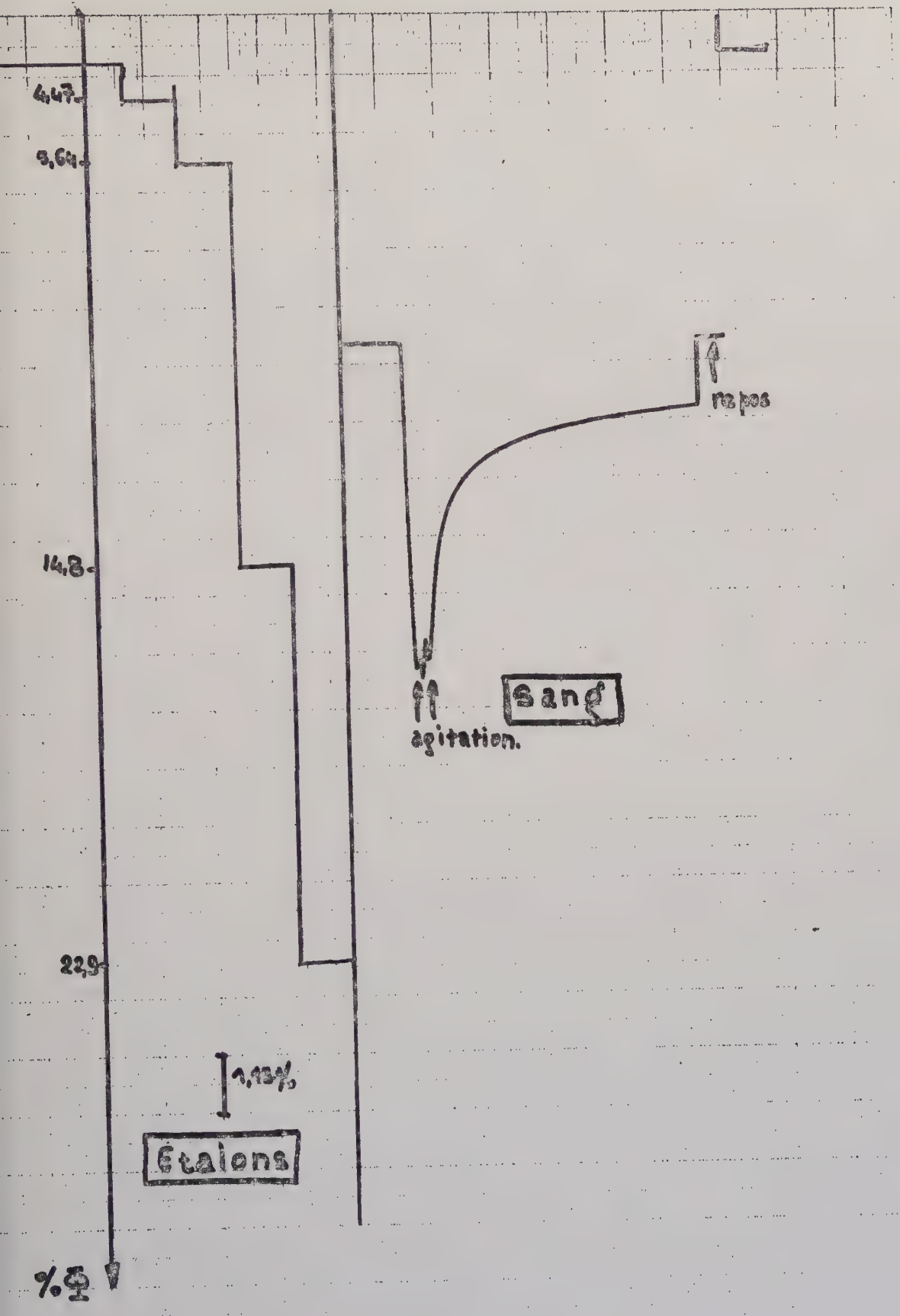


Fig 5.



- Fig 6 -

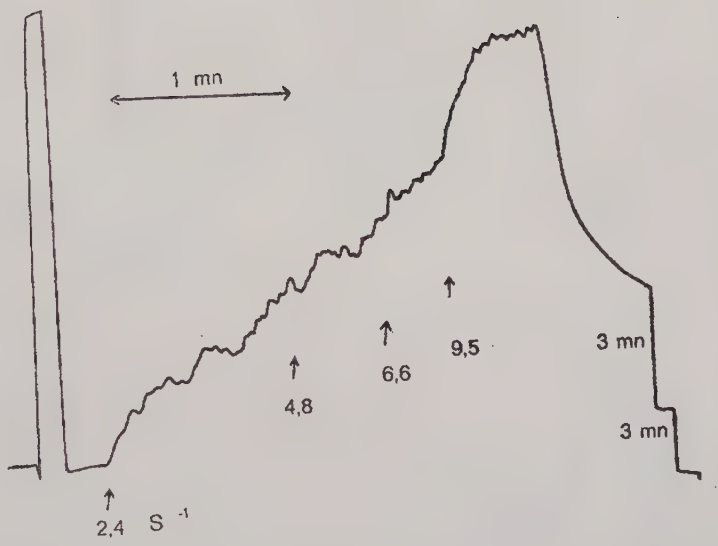


Fig 7.

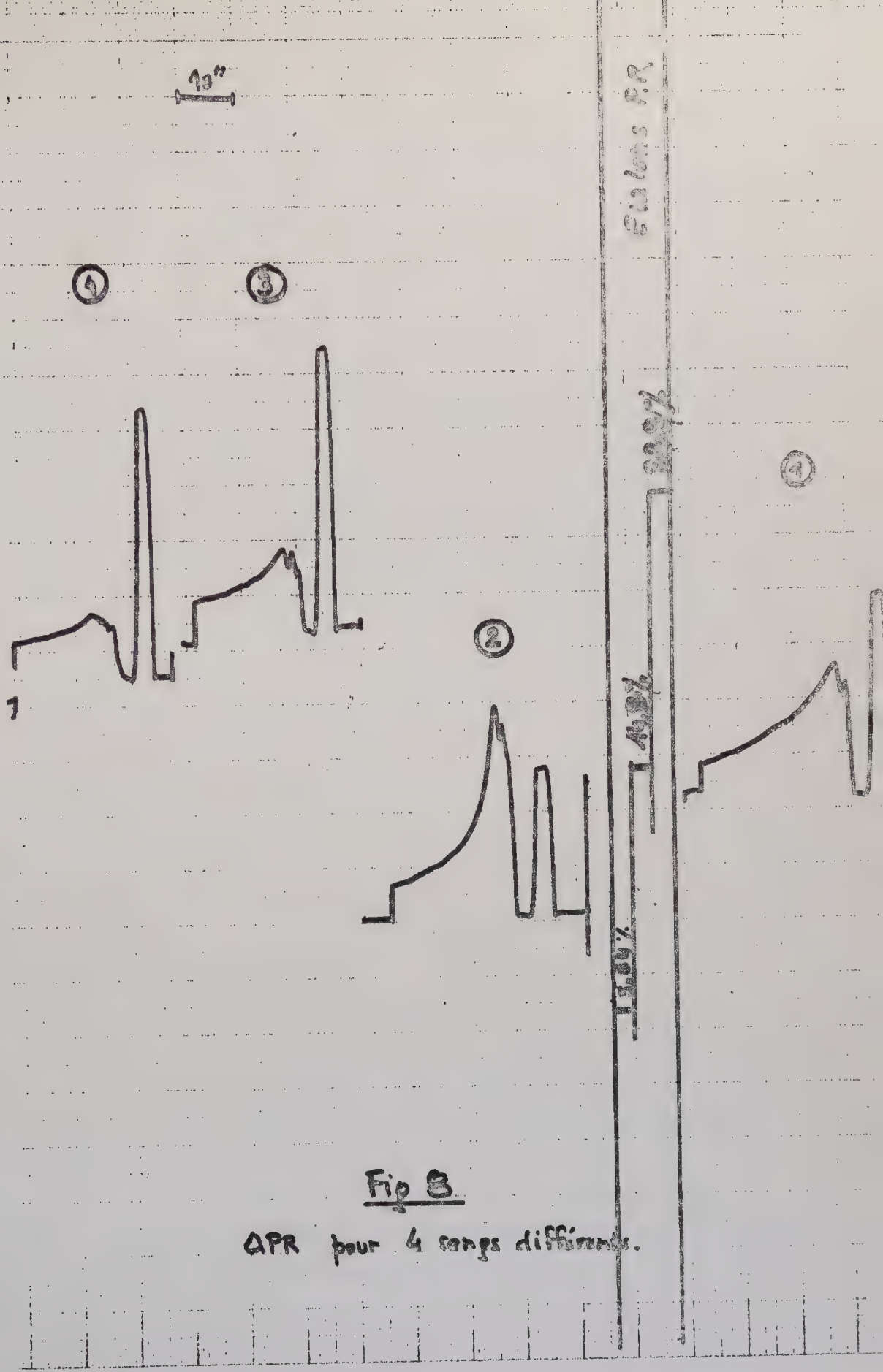


Fig 8

QPR pour 4 rangs différents.

CHAPITRE 2

RESULTATS

Les variations de pouvoir rélecteur enregistrées ne portent que sur les variations de flux émanant de la suspension. Or la face antérieure de la cuve réfléchit une portion fixe, invariante du flux incident. En vue des études quantitatives, il faut dans les mesures, éliminer ce flux spéculairement réfléchi.

Ce flux, constant pour une cuve donnée, peut être mesuré, en plaçant dans cette cuve une encre noire parfaitement absorbante (spectrophotometric ink, Bauch et Lomb). Le flux alors enregistré revient exclusivement à la face antérieure de la cuve. Avec les cellules employées, le flux spéculairement réfléchi est de 3% du flux incident. (figure 6)

D'autre part, en accord avec la théorie, nous avons pu vérifier que le rapport flux incident sur flux rétrodiffusé était bien indépendant du flux incident ou de l'épaisseur de la cuve. Il est enfin indépendant de la concentration tant que le flux transmis est toujours nul. De ce fait les dilutions modérées que nous avons parfois été amené à faire au cours des épreuves sont sans incidence sur la validité des relations entre les flux enregistrés et les surfaces réfléchissantes.

A)Résultats pour des sangs normaux et pathologiques

Les sangs normaux frais, prélevés le matin sur citrate, à hématocrite de 40%,présentent les variations des pouvoirs réflecteurs de figures 4,7,8.

Les différents accidents notés sur la figure 4 ont la signification suivante:

-a) ligne de base,correspondant à un flux rétrodiffusé stable obtenu après quelques minutes de repos.

-b) augmentation fixe du flux rétrodiffusé,par levée transitoire d'un filtre de densité optique connue sur le trajet du faisceau,augmentant donc le flux incident.

-c) agitation mécanique transitoire par une pipette de la suspension.

-d) arrêt de l'agitation et début de la recombinaison des globules entre eux.

-e) arrêt momentané du déroulement du papier.

-f)retour au pouvoir réflecteur initial,stable au bout de 5 mn.

On appelle variation du pouvoir réflecteur la distance AC.

La mise en place d'écransréflecteursétalons ne permet plus seulement de connaitre les variations relatives,mais aussi les valeurs absolues des flux avant et après agrégation.(figure8 sang numéro 2)

Normalement lepouvoir réflecteur enregistré pour un sang agrégé est de 9% voir Figures 6 et 8).Après dissociation,le flux rétrodiffusé passe à I7% environ. Compte tenu du flux spéculairement réfléchi par la face antérieure de la cuve, les flux nets sont donc respectivement de 6 et I4%.

La moyenne de 34 sangs normaux est un peu plus basse:5,9 et I3,6 mais confirme tout à fait les résultats de Bich(rapport des flux:2,3,écart type 0,3I)

Bien que l'évolution du flux rétrodiffusé après levée de l'agitation ne soit pas une fonction simple (nous le reverrons),il est commode de caractériser la vitesse de retour à l'équilibre par $T\frac{I}{2}$ .Ce temps est normalement de 6 secondes. Enfin la valeur de base est atteinte en 5mn maximum pour un sang normal.

En routine, la simple comparaison des flux rétrodiffusés avant et après agrégation testée par la levée du filtre étalon suffit à caractériser un sang donné, mais on voit sur la figure 8,comment l'amplitude enregistrée dédend ,indépendem-

ment de l'agrégation,de la reflexion diffuse par les globules (une même variation relative donne une amplitude beaucoup plus importante pour les sangs très réflecteurs).

De nombreux sangs pathologiques ont été testés par cette méthode. L'exemple le plus caractéristique est celui du sang d'un malade atteint d'une maladie de Waldenström (figure9),où l'on sait que des rouleaux très importants sont formés.
Comme on le voit,la variation du pouvoir réflecteur est très importante,correspondant à un état initial fortement agrégé,et,corrélativement,la vitesse de retour à la normale après l'agitation est considérablement augmentée (temps de demi-recombinaison de 2 secondes.)La recombinaison totale est obtenue en moins de trois minutes.
D'autres sangs ont au contraire des variations de pouvoir réflecteur faibles (voir sangs 3et 4 de la figure 8) et des temps de recombinaison très longs,mais ces courbes sont habituellement obtenues après action des désagrégeants.

D'une façon générale,comme l'avaient déjà montré d'autres auteyrs,(7,9),il existe une bonne corrélation entre les variations du pouvoir réflecteur et la vitesse de sédimentation sanguine.

B.Modifications du pouvoir réflecteur sous l'effet des agents pharmacodynamiques

Il est clair que la formation de rouleaux par les globules rouges est due aux interactions cellulaires,et donc qu'elle dépend de la composition chimique de la membrane cellulaire et de son microenvironnement.

Or parmi les nombreuses drogues employées en pharmacopée,la plupart supposent un métabolisme cellulaire et doivent donc traverser les membranes.Il nous a semblé intéressant de voir si ces drogues,souvent administrées par voie intraveineuse,ne pouvaient pas agir sur la membrane du globule rouge et modifier ainsi éventuellement les liaisons interglobulaires.Cette éventualité est d'

autant plus intéressante à considérer que la microrhéologie du sang est considérablement influencée par cet état d'agrégation(voi IIème partie)

Cette étude a porté sur les grandes classes de médicaments administrés en intraveineux.Nous rappelerons ici les principaux résultats qui ont été intégralement consignés dans un autre travail(IO).

I)L'action de la polyvinyl-pyrrolidone(PVP),parfois employée comme substitut du plasma ,est spectaculaire.
A hématocrite égal,la substitution de 50% du plasma par un volume égal de PVP (Subtosan),augmente considérablement le pouvoir réflecteur et la cinétique de retour après arrêt de l'agitation (figureIO).Comme sur la figure 9,ces faits témoignent d'une importante augmentation de la longueur des rouleaux à l'équilibre.
L'action des dextranes de haut poids moléculaire est analogue.

2)L'action des dextranes de baspoids moléculaire est au contraire tout à fait différente(figure II)(Rhéomacrodex).Leur action désagrégeante est bien connue et largement employée en clinique.Une substitution de 50% du plasma , diminue considérablement l'amplitude de la variation du pouvoir réflecteur et dimi de même la cinétique de formation des rouleaux.

3)Le NaCl isotonique au plasma(O,I5O M) a une action comparable.

4)Parmi les antibiotiques étudiés,les penicillines ,naturelles ou synthétiques ,se sont révélées être de très puissants désagrégeants:à la dose de IO.OOO unités par millilitre de sang,les rouleaux sont complètement dissociés et la variation du pouvoir réflecteur nulle.
Ce fait remarquable a été vérifié plusieurs fois avec des sangs différents.

Les Cyclines et la Rifampycine ont montré une action du même ordre,mais moins importante.Par contre la Streptomycine,la Kanamycine,la Colimycine,le Chloramphénicol,le Rimifon,se sont révélés sans action sur la variation du pouvoir réflecteur et donc sur la dissociation des globules.

5)Les antiinflammatoires,actifs par définition dans des circonstances où la longueur des rouleaux est souvent augmentée,pouvaient à priori être supposés actifs sur la dissociation.

On a pu effectivement constater que l' hydrocortisone à dose forte,la phényl-butazone,et le salicylate à doses très faibles(figure I2),étaient de très puissants dissociants:la dissociation est permanente et l'agitation n'augmente pas le pouvoir réflecteur.
Le pyramidon a une action comparable.

6)Parmi les autres classes de drogues étudiées,il faut retenir essentiellement:
-l'action nulle de l'héparine et du citrate de soude:ce qui justifie l'emploi de ces anticoagulants pour les prélèvements .
-l'action nulle des symphaticomimétiques,de l'Atropine, de l'Hydergine.
-l'action dissociante de l'acide ε aminocaproïque à dose faible,de l'acétylcholine et de la vitamine C à dose forte.

Il n'est actuellement pas possible d' expliquer pour chaque drogue son mode d'action sur la formation des rouleaux, mais il faut cependant retenair que ces produits sont capables de modifier (par adsorption par exemple) la composition de la membrane ou de l'environnement périmembranaire du globule rouge.D'autre part,indépendemment de leurs autres actions,ces drogues peuvent de ce fait modifier les conditions d'écoulement du sang dans les capillaires.
Ces faits ne sont pas sans incidence clinique.

Néanmoins à ce stade,il apparait que la notion essentielle à considérer,soit les interactionsinterglobulaires :l'étude des cinétiques d'agrégation va nous permettre d'atteindre quantitativement cette grandeur capitale.

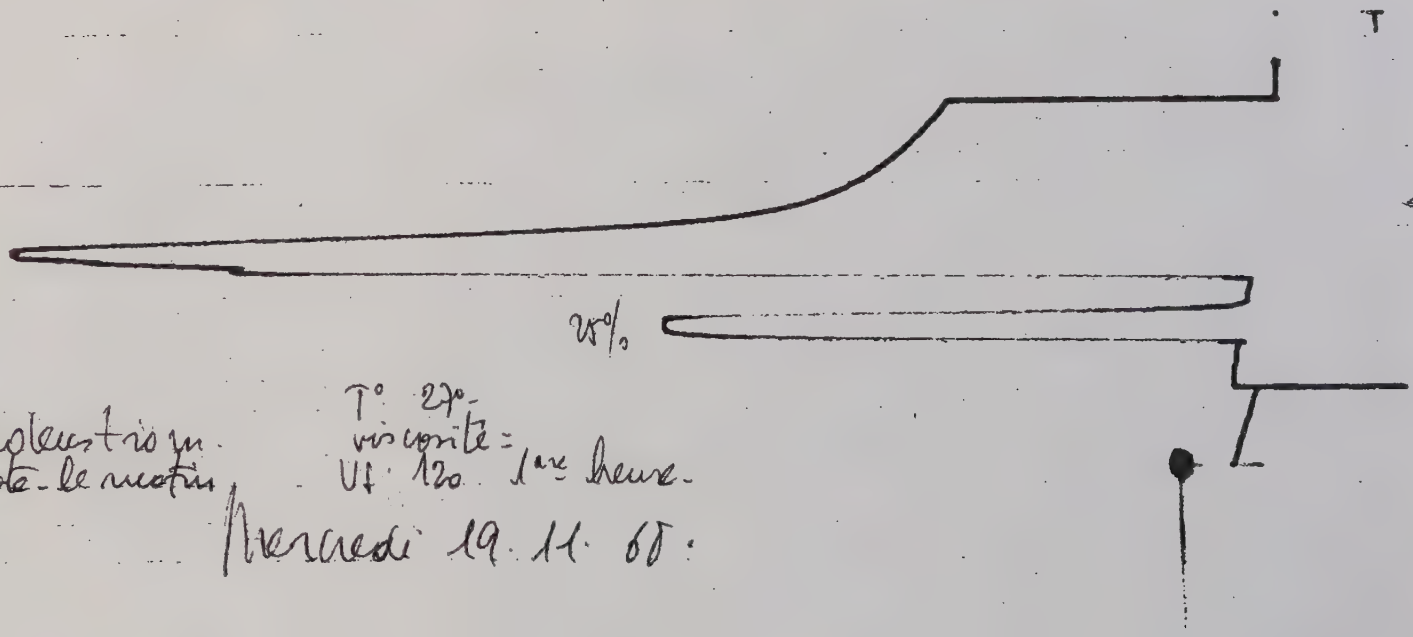


Fig. 9.

Malade de Waldenström
prélevé s/ Citrate le matin

T° 27°
viscosité :
Ut 120 1ère heure.

Mercredi 19.11.68.

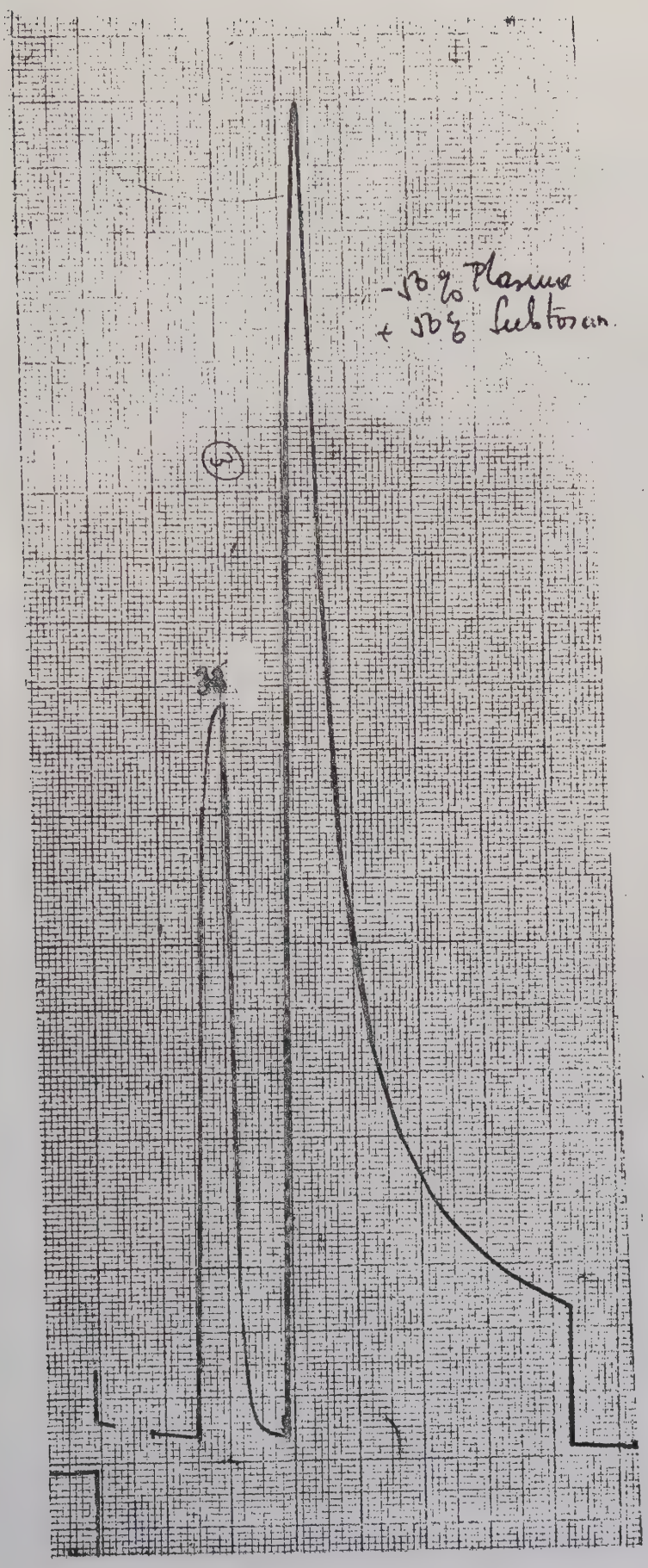


Fig 10

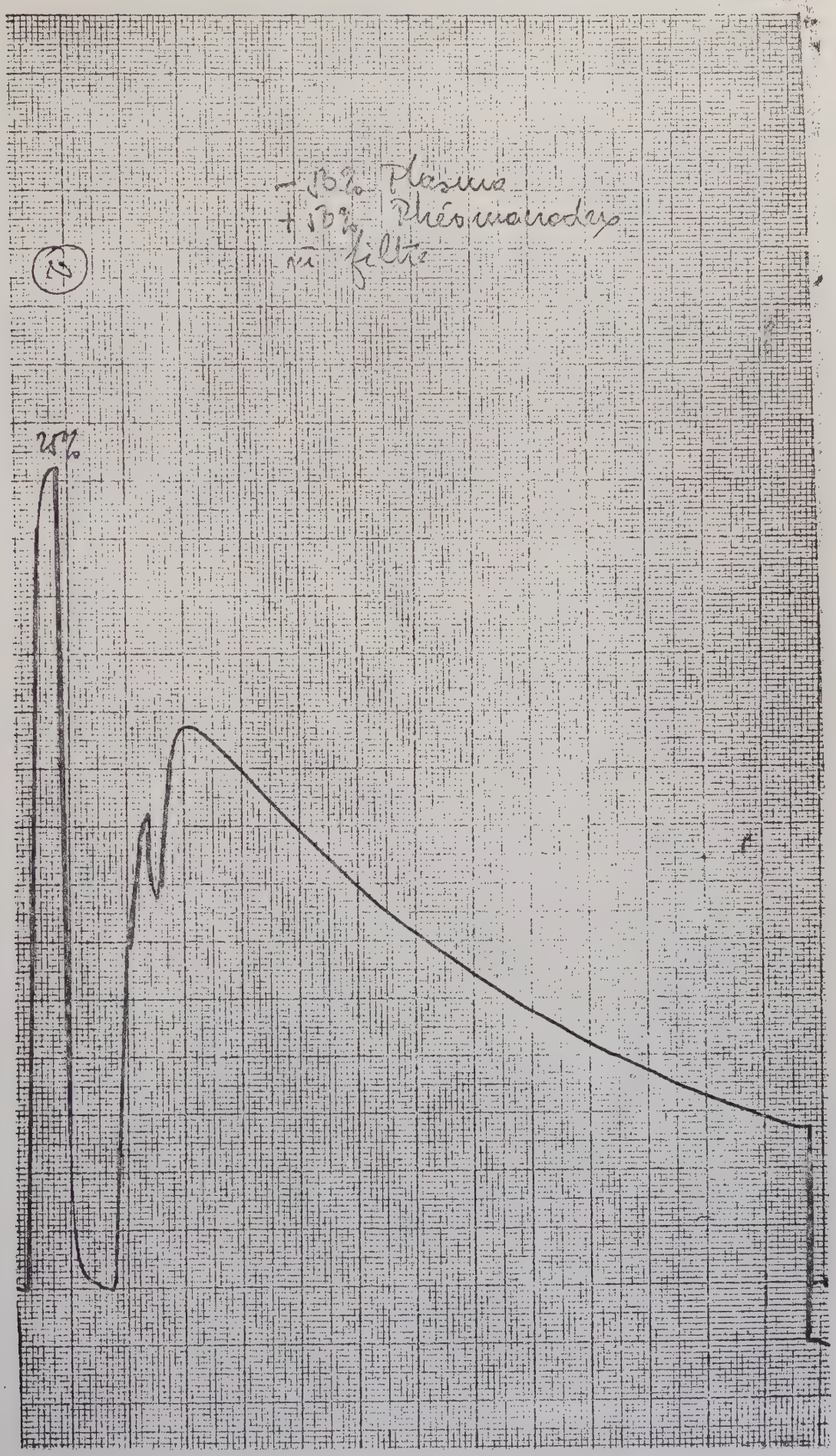


Fig 11

Interférences par le salicylate de Na°

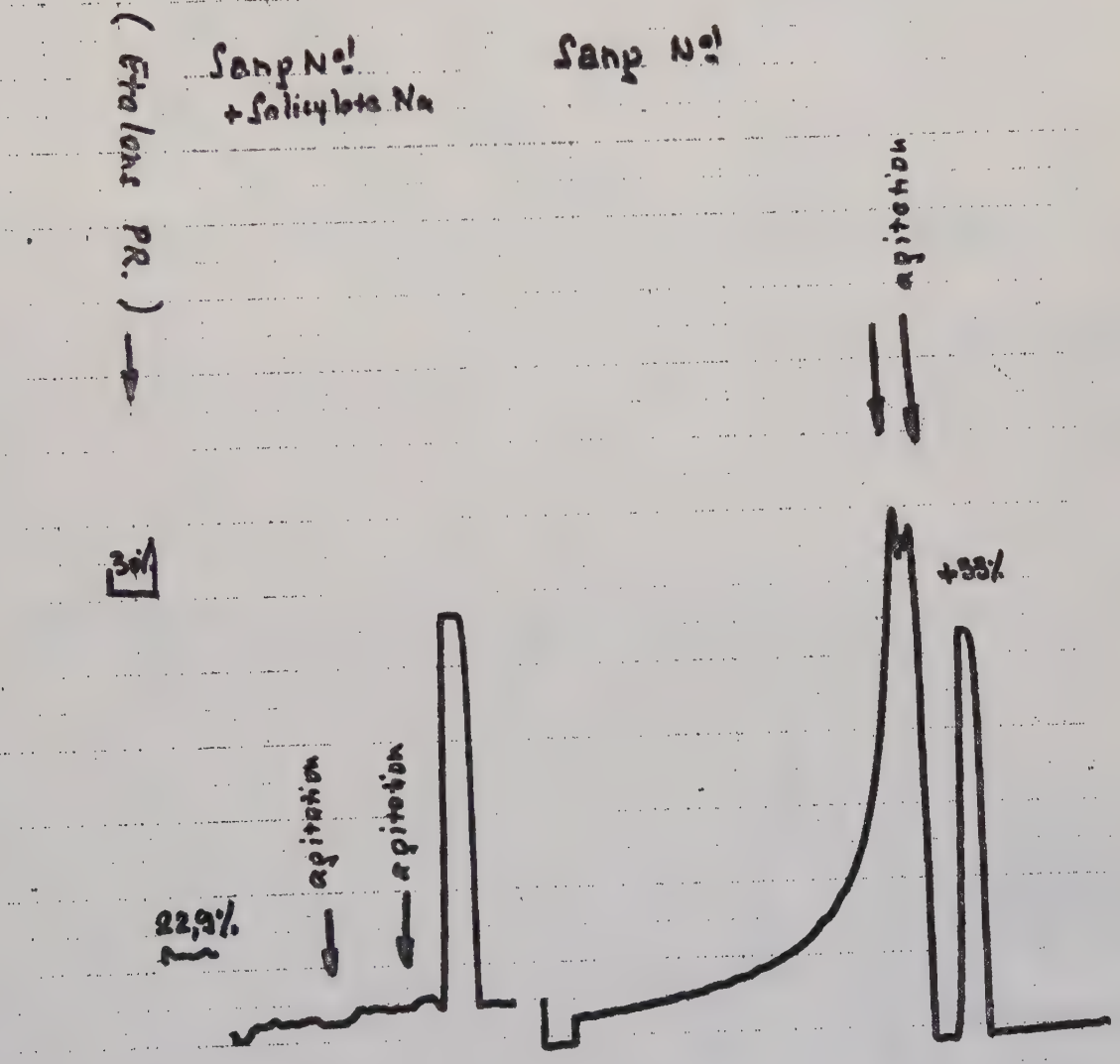


Fig 12

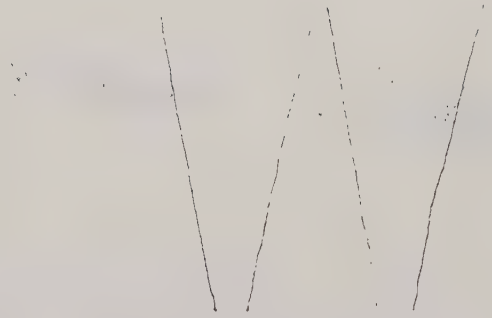


Fig 13

Φ'_r (% Φ_0)

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{\Phi_r}{\Phi'_r}\left[\frac{\Phi_0 - \Phi'_r}{\Phi_0 - \Phi_r}\right]^2$$

Φ_r = Flux rétrodiffusé après dissociation totale.
Φ'_r = Flux pendant l'agrégation

$\Phi_r = 20\,\% \Phi_0$

$\Phi_r = 17\,\% \Phi_0$

$\Phi_r = 14\,\%$

$\bar{n}$

1 2 3

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{N\left[2\pi R^2 + 2\pi R \frac{R}{2}\right.}{m\left[2\pi R^2 + 2\pi nR\right.}$$

N = Constant = $m n$

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{3n}{2+n}$$

m = Nombre de rou
n = Nb d'hématies
rouleau

1 2 2,5 3

Fig 13

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{\Phi_r}{\Phi'_r}\left[\frac{\Phi_0 - \Phi'_r}{\Phi_0 - \Phi_r}\right]^2$$

Φ_r (% Φ_0)

Φ_r = Flux rétrodiffusé après dissociation totale

Φ'_r = Flux pendant l'agrégation

$\Phi_r = 20\,\% \Phi_0$

$\Phi_r = 17\,\% \Phi_0$

$\Phi_r = 14\,\%$

n

1 2 3

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{N\left[2\pi R^2 + 2\pi R \frac{R}{2}\right.}{m\left[2\pi R^2 + 2\pi n R\right.}$$

N = Contact = m n

$$\frac{\sigma}{\sigma'} = \frac{3n}{2+n}$$

m = Nombre de rou

n = Nbre d'hématies

rouleau

1 2 2,5 3

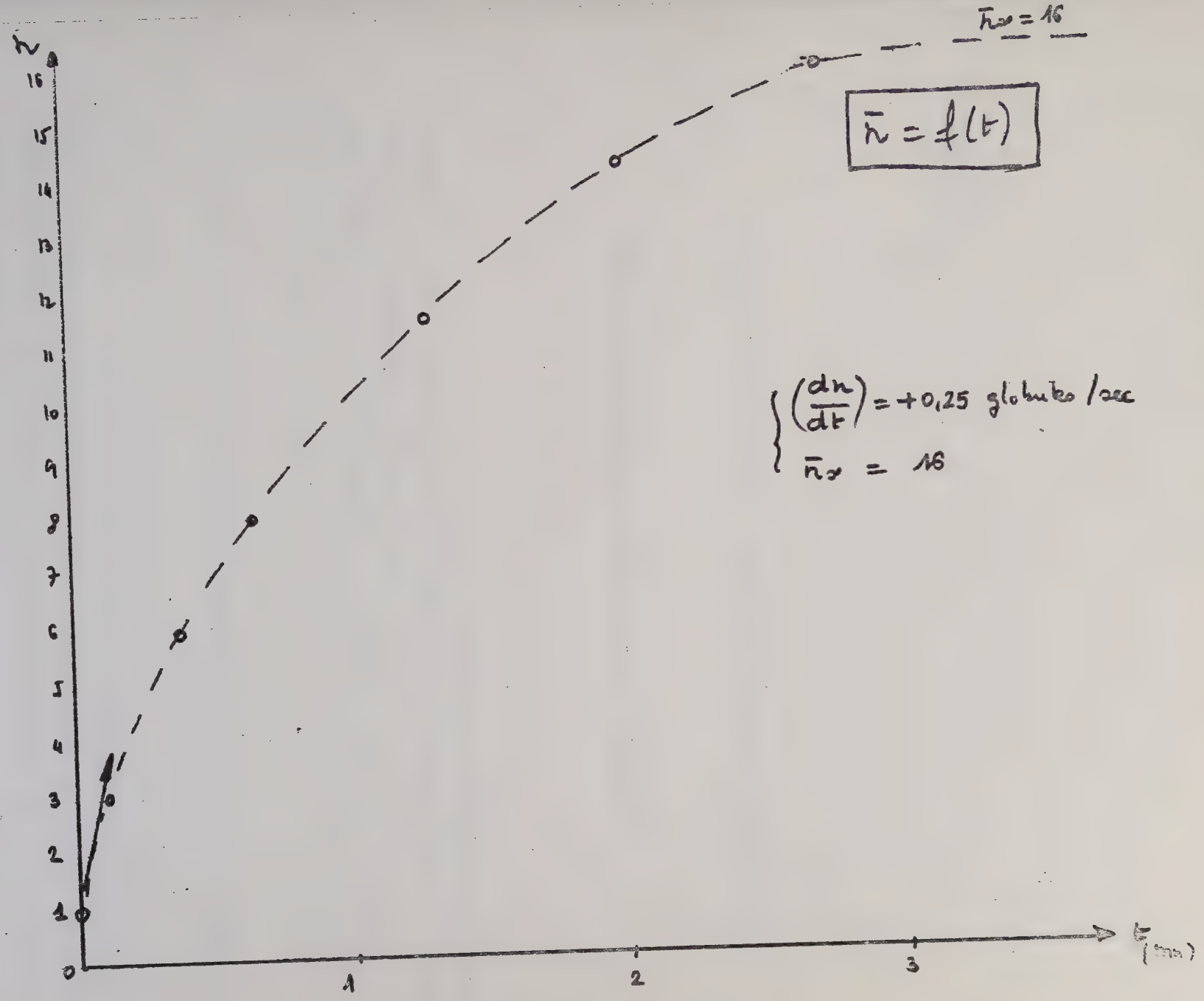

$\bar{n}_\infty = 16$
$\bar{n} = f(t)$
$\left(\frac{dn}{dt}\right) = +0{,}25$ globuli/sec
$\bar{n}_\infty = 16$
$\bar{n}$
t (min)
0
1
2
3
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

Fig 14

CHAPITRE 3

THEORIE DE LA CINETIQUE DE L'AGREGATION REVERSIBLE DES GLOBULES

MESURE DES ENERGIES D'INTERACTION INTERGLOBULAIRE

La donnée expérimentale étant le pouvoir réflecteur à chaque instant, on peut facilement à l'aide de l'équation I (page10) relier ces flux aux aires réfléchissantes.
Quand on connait le mode d'agrégation, ici linéaire, en rouleau, on peut dès lors relier ces aires aux nombre moyen de particules constitutives des agrégats à chaque instant. (figures I3, I4)

Pour un sang normal, la cinétique d'agrégation est décrite par la figure I4.

D'autre part, compte tenu de la tailles et de la composition des globules, il est raisonnable de rapprocher cette cinétique d'agrégation des problèmes classiques de cinétique de floculation des colloïdes lyophobes.

Depuis Smoluchowski,de nombreux auteurs se sont intéressés à cette cinétique qui présente de nombreuses analogies avec certaines cinétiques de polymérisation chimique.
Plusieurs développements ont été proposés et nous reprendrons celui établi pour décrire l'agrégation de macroagrégats protidiques et de particules virales (I,I3,I4,I5,I6)

A) Théorie de la cinétique d'agrégation .

Dans le cas général,on peut écrire que $n_1$nombre par cm^3 d'agrégats contenant i particules,évolue comme suit:

$$\frac{dn_s}{dt} = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{i=s-1} A_{i\,s-1} n_i n_{s-i} - m_s \sum_{i=1}^{i=\lambda} A_{is} n_i$$
$$- B_s(m-1)m_s + 2\sum_{i=s+1}^{i=\lambda} B_i m_i$$

n_0 =nombre initial par cm^3 de particules élémentaires
A_{lm} =fréquence d'association d'un agrégat de l particules avec un agrégat de m particules.
B_q =fréquence de dissociation d'un agrégat de q particules.

$$\sum_{i=1}^{i=\lambda} i n_i = n_0$$

En admettant en première approximation que les fréquences d'association et de dissociation soient indépendantes du nombre de particules constitutives des agrégats,la relation précédente se simplifie et se réduit à l'équation de Tobolsky(27)

$$\frac{dn_s}{dt} = \frac{A}{2}\sum_{i=1}^{i=s-1} n_i n_{i-s} - A n_s \sum_{i=1}^{i=\lambda} n_i - B(s-1)n_s$$
$$+ 2B\sum_{i=s+1}^{i=\lambda} n_i$$

Achaque instant le nombre moyen de particules constitutives d'un agrégat est donc:

$$x_{(t)} = \frac{\sum_{1}^{\lambda} \Delta n_\Delta}{\sum_{1}^{\lambda} n_\Delta}$$

En supposant que $B \ll n_0 A$, condition indispensable àune égrégation appréciable, il vient:

$$x_{(t)} = \frac{1 + \sqrt{\frac{2B}{n_0 A}} \coth \sqrt{\frac{n_0 AB}{2}} t}{\sqrt{\frac{2B}{n_0 A}} \coth \sqrt{\frac{n_0 AB}{2}} t .}$$

Pour t petit, on a alors:

$$x = 1 + \frac{n_0 A}{2} t - \frac{n_0 A^2 B}{12} t^3 \ldots$$

d'où:

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{t=0} = \frac{n_0 A}{2}$$

Lorsque l'état stationnaire est atteint, le nombre moyen de particules constitutives des agrégats est alors:

$$x_e = \sqrt{\frac{n_0 A}{2B}}$$

Les valeurs numériques des coefficients d'association et de dissociation peuvent donc être connues par la vitesse initiale de formation des agrégats et par le nombre moyen de particules à l'équilibre.

Quelle est la signification physique de ces coefficients?

B)Signification des coefficients.

Il a été démontré(I6,I7)que dans le cas de particules dissymétriques (comme les globules rouges),la valeur moyenne du coefficient d'association spontan des particules entre elles,est:

$$A = \frac{2kT}{\pi\eta} F(V)$$

F(V)=facteur représentant la fraction des chocs efficaces,compte tenu d'une éventuelle barrière de potentiel.

η =viscosité du milieu.

D'autre part,en admettant que le temps moyen de présence d'une particule à la surface d'un agrégat soit sensiblement(85):

$$l\sqrt{\frac{\pi m}{2kT}}\, e^{\frac{W}{kT}}$$

m=masse de la particule,l=longueur

W=énergie moyenne d'interaction d'une particule avec ses voisines

il vient:pour B,fréquence de dissociation:

$$B = \frac{1}{l}\sqrt{\frac{2kT}{\pi m}}\, e^{-\frac{W}{kT}}$$

Connaissant A,fréquence d'association par la dérivée à l'origine de n(t) (figureI4),et connaissant B par le nombre moyen à l'équilibre,on peut donc calculer $\frac{W}{kt}$

Pour un sang normal,les données numériques sont en moyenne les suivantes:

-vitesse initiale d'agrégation:+0,25 globule par seconde

-nombre moyen de particules à l'équilibré:I6

-coefficient d'association:IO^{-IO}

-coefficient de dissociation:IO^{-3}

$\frac{W}{KT}$=II,27,soit à la température ambiante W=4,5 IO^{-I3} ergs par globule; soit encore 4,5 IO^{-7} ergs par Cm^2. si on suppose que toute la surface du globule participe uniformément à cette liaison.

Pour des vitesses de recombinaison beaucoup plus grandes(maladie de Waldenström ou sang plus Subtosan)il vient:

-vitesse initiale d'agrégation:+0,5 globule par seconde

-nombre moyen de particules à l'équilibre:30 et plus

-coefficient d'association: 2. IO^{-IO}

-coefficient dé dissociation : 5. IO^{-4}

- $\frac{W}{KT}$=I7, soit environ I,5 fois les valeurs normales.

Pour des sangs faiblement associés par contre les énergies de liaison deviennent rapidement insuffisantespour contrebalancer l'agitation thermique (énergies de l'ordre de IO kT)

Ces valeurs sont extrêmement faibles mais peuvent être confrontées avec d'autres.

En effet,nous avons vu que l'on peut facilement substituer à la cuve plate une cuve cylindrique et étudier la couple nécessaire pour commencer à dissocier les agrégats et augmenter le pouvoir réflecteur.(figure 5).

Or,en écrivant les cinétiques d'agrégation en introduisant un terme d'interaction dynamique,il a été démontré(I,I3,I4)que l'on pouvait relier la contrainte

minimale nécessaire pour désagréger, à l'énergie moyenne de liaison des particules.

En effet par extension de la relation de Kuhn, on peut écrire que la force de tension maximale à laquelle est soumise une particule constitutive d'un agrégat de longueur l est: (86)

$$\frac{3\pi}{32}\,\eta g l l_0$$

avec :

η =viscosité du milieu

g =vitesse de cisaillement

l_0 = longueur de la particule

Tandis que la force moyenne d'attraction de cohésion est sensiblement:

$$\frac{12\,W_0}{l_0}$$

La dissociation commencera donc pour:

$$g_r = \frac{128\,W}{\pi\eta\, l_0^2\, l_1}$$

avec g_r =seuil de contrainte de rupture.

Expérimentalement, la valeur de ce seuil est très basse, difficile à mesurer avec précision, mais de l'ordre de 0,4 sec^{-1}, ce qui donne $W=4.10^{-13}$ ergs, par globule, donc une énergie de liaison du même ordre que celle déterminée à partir des cinétiques d'agrégation.

Ces valeurs sont évidemment très faibles. Nous allons les comparer

successivement aux rares résultats de ce genre trouvés dans la littérature avant d'envisager une interprétation physique de la nature des interactions interglobulaires.

Sang N°	Ht	Φ_r (% Φ_0)	Φ_r (% Φ_e)	$\left(\frac{dn}{dt}\right)_{t=0}$	$\bar{n}_{t=\infty}$	$A_{(associa.)}$	$B_{(dissoc.)}$	$\frac{W}{kT}$
1	0,4	17	7,5	+0,25	15	$1,2\,10^{-10}$	$0,7\,10^{-3}$	12,5
2	0,4	15	8,3	+0,27	17	$1,3.10^{-10}$	$0,9.10^{-3}$	12,5
3	0,5	14	6,2	+ 0,20	12	$0,7\,10^{-10}$	$1,1.10^{-3}$	12
4	0,4	17	7,5	+0,20	13	10^{-10}	$1,1\,10^{-3}$	12,2
5	0,45	17	7,9	+0,23	12	10^{-10}	$1,6.10^{-3}$	12
6	0,30	12	6	+ 0,17	8	$1,2.10^{-10}$	$2,9.10^{-3}$	11,3
7	0,50	19	9,6	+ 0,17	10	$0,7\,10^{-10}$	$1,7.10^{-3}$	11,5
8	0,42	20	9,5	+ 0,20	13	$0,9.10^{-10}$	$1,1.10^{-3}$	12,2
9	0,45	17	7,6	+ 0,25	15	$1,1.10^{-10}$	10^{-3}	12,4
10	0,4	14	7,2	+0,10	5	$0,5.10^{-10}$	4.10^{-3}	11

Fig 15 : Sangs Normaux.

CHAPITRE 4

CRITIQUE DES RESULTATS

AUTRES METHODES DE MESURE DES ENERGIES DE LIAISON INTERCELLULAIRE

IL est tout d'abord bien entendu que compte tenu de toutes les approximations effectuées, les énergies de liaison précédemment mesurées ne sauraient être autre chose que des ordre de grandeur.

Néanmoins ces dernières peuvent être utilement comparées avec les données de la littérature énoncées pour des systèmes colloidaux ou pour d'autres cellules.

Etudiés au rhéoturbidimètre, les agrégats de protéine dénaturée par la chaleur s'agrègent avec des énergies de liaison de $\frac{W}{kT}=20$.
Les virus de mosaïque de tabac en présence de KCl présentent une énergie de liaison de $\frac{W}{kT}=15$, soit $W=6.10^{-13}$ ergs par particule (1,16)

C'est également l'ordre de grandeur des énergies mesurées et calculées par d'autres auteurs étudiant des particules de latex de 0;5 μ environ dont ils suivent optiquement les cinétiques d'agrégation.

De rares travaux ont étudié les énergies de liaison entre les cellules e llés mêmes et entre les cellules et leur s-upport.Ils ont été récemment recensés dans un excellent ouvrage(38)

Certaines méthodes ne donnent que des valeurs relatives:
Ce sont essentiellement les techniques d'étude des adhésivités cellulaires aux couvercles de verre,ou de différents materiaux(matérière plastique, nylon,téflon...).Ces techniques sont même exploitées pourséparer des cellules (globules blancs et lymphocytes sur fibre de verre)(35,36,37,92,93)

Les autres techniques tentent de donner des valeurs absolues:

Plusieurs auteurs ont utilisé la technique de séparation des cellules des surfaces auxquelles elles adhèrent en les soumettant à un champ de cisaillement:(39,40)
Des cellules néoplasiques(sarcomes ostéogéniques)se lient à leur support avec des énergies de 60.10^{-11} ergs par cellule de 10 μ de rayon.
En fait cette valeur est très imprécise car elle est soit sousestimée si le champ déforme la cellule,soit surestimée si un arrachement partiel survient.
Les valeurs acceptables sont donc de l'ordre de 10^{-5} à10^{-12} ergs par cm^2(38).

Qaand la force ionique du milieu est très basse,des cellules sont capables de se décoller de leur support sous l'effet de leur propre poids.Des cellules de cancer du foie sont ainsi capables de se décoller avec une énergie de $3,2.10^{-5}$ergs par cm^2,soit 9.10^{-11} ergs pour toute la cellule.
Comme on le voit ces techniques étudient essentiellement les adhésions aux supports et non les énergies de liaison des cellules entre elles qui peuvent être de valeur et de nature très différentes.

En étudiant les cinétiques de floculation des cellules placées dans un gradient de cisaillement,on peut définir un "quotient de stabilité" et calculer l'énergie correspondant aux liaisons formées(38).Pour la majorité des cellules les énergies trouvées sont ainsi de 10^{-4}ergs par cm^2.

D'autres auteurs enfin ont étudié au microviscosimètre les taux de cisaillement nécessaires pour dissocier complètement les rouleaux d'hématies formés.
La dissociation totale est obtenue comme l'ont confirmé d'autres auteurs au microscope optique et nous même au réflectomètre(47),pour des taux de cisaillement de I à50 sec^{-I} .Certains en ont exprapolé une force correspondant à 5 IO^{-7} dynes par globule. (4I)
Cette valeur nous semble très élevée surtout pour des liaisons aussi facilement labilesque celles des globules rouges .Cette technique suppose par ailleurs que le comportement rhéofluidifiant du sang soit exclusivement du aux associations intercellulaires,et nous verrons que ce n'est justement pas le cas.

Par micromanipulation,la force nécessaire pour séparer deux globules rouges a été trouvée égale à IO^{-3} dynes par Cm^2 (4I,43) ,alors que d'autres auteurs trouvent des valeurs beaucoup plus grandes pour les mêmes liaisons(I dyne par cm2)(98)
Indépendemment des causes d'erreur que nous avons déjà vues (arrachement,déformation de toute la cellule)cette technique introduit en plus les erreurs duées aux phénomènes capillaires dans les micropipettes d'aspiration,qui peuvent être beaucoup plus importants que le phénomène à étudier.Cette technique explore au total beaucoup plus les propriétés mécaniques des membranes que l'adhésivité des cellules entre elles.

En conclusion,les travaux les moins criticables,basés sur les cinétiques d'agrégation,font état pour la plupart des cellules,d'énergies de liaison de l'ordre de IO-4

à IO-5 ergs par cm^2,si on suppose que toute la surface cellulaire participe au contact.

Dans ces conditions,il est tout à fait raisonnable d'admettre pour des cellules aussi peu agrégeantes que des globules rouges,des énergies de $4.IO^{-7}$ ergs par cm2 que nous avons expérimentalement mesurées.

Les énergies de liaison intercellulaire sont évidemment une conséquence de la composition superficielle de la membrane érythrocytaire.
Il était dès lors intéressant de confronter les données expérimentales avec les données théoriques de la théorie DLVO de stabilité des colloides lyophobes.
Auparavant,un bref rappel des propriétés physicochimiques du globule rouge et de sa membrane s'impose.

CHAPITRE 5

RAPPEL DES PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU GLOBULE ROUGE

A)Données morphologiques

Le globule rouge a certainement été la première cellule vivante vue au microscope optique par Lowenhocke au XVIII ème siècle.
Chez l'homme c'est une cellule ànuclée biconcave de 7,5 μ de diamètre I,84 à 2,05 μ d'épaisseur,I40 μ^2 de surface 90 μ^3 de volume.
Cette cellule est susceptible de se déformer:ainsi dans un écoulement capillaire, la microcinématographie permet de constater son adaptation au vaisseau et sa déformation en"parachute" sous l'effet des pressions axiales qu'elle subit.

Depuis quelques années,la microscopie à balayage a enrichi la connaissance tridimensionnelle du globule rouge.
La surface apparait homogène,lisse,quand le globule est lavé.Non lavé,le globule présente par contre un"manteau"rugueux,inhomogène.

Les modifications morphologiques des membranes sous l'action des anticorps ont montré,au cours de l'agression immunologique,la formation progressive de

digitations croissantes qui s'enchevêtrent avec celles des autres globules.(96)

Au microscope électronique,la membrane du globule rouge apparait comme un double trait sombre.L'épaisseur de cette membrane est de 70 Å (62)
Les métaux lourds qui se fixent électivement sur les glycoprotéines apparaissent essentiellement à la face externe cette membrane(57) témoignant de la présence de ces composés à ce niveau.
La microscopie électronique a également montré que lors des agrégations réversibles,les globules n'étaient pas en contact étroit ,mais restaient séparés par une distance de IOOÅ environ.Il est certain que la dessication et la fixation introduisent des artéfacts qui limitent la valeur de ce chiffre mais l'ordre de grandeur demeure.
La composition du milieu interparticulaire ne peut être précisée.

B)Données biochimiques de la membrane (62)

Une quantité énorme de travaux lui ont été consacrés.Si la composition chimique est actuellement à peu près connue,l'organisation des molécules et la structure de la membrane sont encore très discutées.

Les lipides représentent 43,6% du poids de la membrane.Ils ont un double rôle de structure et de fonction.
Ce sont respectivement:des phopholipides(65%),du cholestérol(23%),des esters de cholestérol (2%),des glycolipides(IO%).
Ces lipides membranaires sont avec des vitesses variables pour chacun d'entre eux,constemment renouvelés.

Tous les lipides globulaires sont pratiquement intramembranaires.

Les glycolipides avec l'acide sialique sont en grande partie responsables des propriétés électrocinétiques du globule rouge.
Ils interviennent également dans le maintien de la forme biconcave du globule,dans le fonctionnement des pompes sodiques et potassiques,ainsi que dans certaines propriétés immunologiques.
Les lipoprotéines sont elles essentielles à considérer dans les modèles structuraux de membrane.Elees interviennent également dans l'activité de certains des 25 systèmes enzymatiques recensés dans les membranes des hématies.

Les protéines sont encore mal connues.Elles représentent en poids 49,2%. Elles ont un rôle fonctionnel et un rôle de structure.On discute actuellement de la possibilité d'une protéine de structure(la spectrine),ayant des propriétés contractiles analogues à celles de la myosine,et qui serait responsable du maintien de la forme du globule.
Les protéines,liées aux sucres pour certaines,sont enfin responsables des propriétés immunologiques du globule.
Ces protéines sont situées en partie à la surface de la cellule et s'échangent rapidement avec le plasma,en partie en profondeur et sont à renouvellement beaucoup plus lent.

Les glucides sont liés aux lipides ou aux protéines.Ils ont surtout un rôle antigénique.Ces glucides,et avec eux l'acide sialique,sont essentiellement localisés dans la région interfaciale externe.

Autres composants:lamembrane contient enfin des ions Ca^{++},et Mg^{++} ainsi que de nombreux systèmes enzymatiques qui peuvent venir s'adsorber à pattir du plasma.
Des anomalies de fonctionnement de cesssystèmes peuvent retentir sur la forme ou les propriétés physicochimiques du globule (dédicit en cholinestérase dans certaines sphérocytoses)

L'organisation de ces différents composants dans la membrane n'est pas encore connue avec certitude.
Deux grandes théories sont en présence

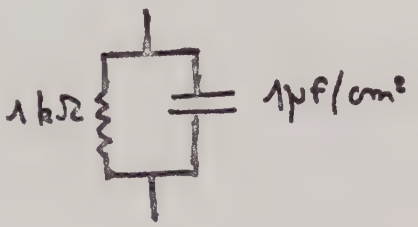
I)Comme pour les autres cellules,un modèle de Danielli,Davson,Robertson peut être proposé. Une double couche de phospholipides,orientés comme une couche bimoléculaire avec les groupes hydrophiles à l'extérieur, est recouverte par une couche de molécules de protéines.

Ce modèle organisé,paracristallin,explique bien certaines propriétés diélectriques mais explique mal les transports rapides transmembranaires. Il est en outre en désaccord avec les données obtenues au microscope électronique quand on a soumis les membranes à 37°.

2)Les modèles"micellaires" (Kavanau,Glauert,Lucy) expliquent mieux ces passages transmembranaires:des micelles lipidiques ayant à leur surface leurs groupes hydrophiles et les protéines.Ces micelles rondes laissent entre elles des espaces que certains ont interprétés comme les pores à travers lesquels se faisaient les echanges rapides .

C)Données électriques

L'impédance membra-aire peut être décrite par le modèle électrique équivalent suivant,mais en fait la capacité ne peut être assimilée à un diélectrique idéal sans perte (59)



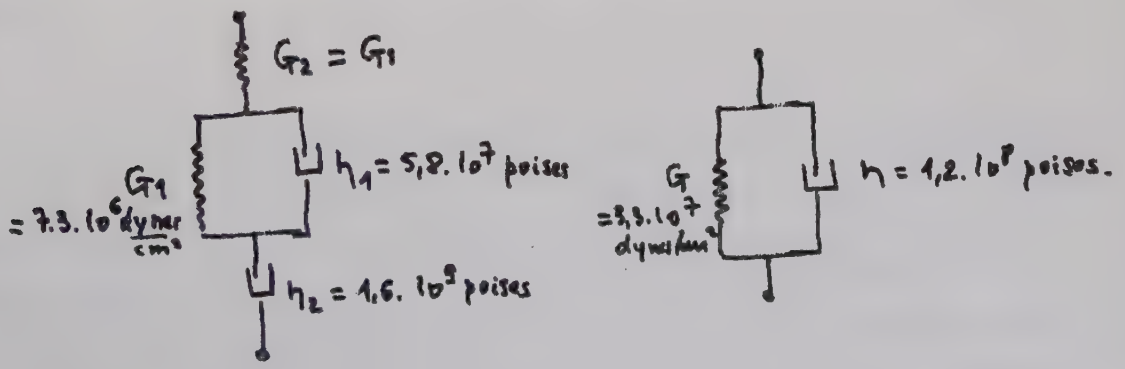
Le potentiel électrocinétique du globule rouge é été largement étudié(54,55).Deux problèmes majeurs se posent à son propos.
a)Les problèmes techniques d'abord,car les phénomènes de polarité des électrodes ne sont pas toujours maitrisés,de même et surtout les problèmes d'eclectro-osmose.
b)Les problèmes théoriques ensuite,car on sait que les potentiels électrocinétiques varient avec la composition superficielle du globule et son age:si bien que présenter un résultat expérimental basé sur la moyenne des migrations électrophorétiques d'une population édidemment hétérogène de cellules,est certes intéressant,mais prête à discussion et doit être interprété avec réserve.
C'est pourquoi,les techniques d'électrophorèse en gradient de ph,qui diminuent ces difficultés et permettent les discriminations des populations,semblent intéressantes(à paraitre).
Néanmoins les auteurs s'accordent sur les données suivantes.
Les migrations electrophorétiques observées sont habituellement de 1µ/sec/volt/cm.,correspandant à un potentiel électrocinétique de l'ordre de -20 mV.Ce potentiel est essentiellement dû à la présence d'acide sialique à la surface du globule,car un traitement par la neuramidinase le fait considérablement diminuer (jusqu'à80%) et le ph_i équivalent du globule rouge est celui de l'acide sialique.Le potentiel superficiel des globules est modifié par l'adsorption de nombreux composés sur la membrane(lipides,dextrans...)(97).Hirst avait lui-même montré que la fixation de virus sur les membranes diminuait la charge superficielle des cellules.

Les immuns sérums anti A et anti B font baisser le potentiel superficiel des globules rouges.L'anti Rh ne le modifie pas (56)

Enfin les potentiels électrocinétiques sont liés à l'activité métabolique de la cellule et sont modifiés avec elle .Il a été montré que des transformations clonales de cellules s'accompagnaient d' une modification des potentiels et de l'allure des agrégats cellulaires en culture.(56)

D)Données Mécaniques

Le globule rouge est légèrement plus dense que le plasma (I,I07 contre I,029)
L'étude des propriétés mécaniques du globule rouge fait actuellement l'objet d'un renouveau d'intérêt:globalement l'érythrocyte doit être considéré comme une goutelette liquide plongée dans un autre liquide.
La rhéologie de la membrane a été étudiée par des techniques de microaspirations et d'hémolyse lente etrapide.
On s'accorde en général pour proposer les modèles suivants:(9I)



Pour expliquer les valeurs étonnemment élévées des modules de viscosité il faudrait sans doute introduire la notion de viscosité bidimensionnelle. Cette notion est d'autant plus concevable que la structure de la membrane pourrait être rapprochée de celles des phases superficielles.

Il faudrait encore pouvoir étudier les propriétés rhéologiques intracellulaires mais on ne dispose actuellement d'aucune technique satisfaisante pour ce faire malgré les abondantes études dans ce sens.(76)

Les tensions interfaciales entre les globules et le plasma sont très mal connues.Là encore les difficultés techniques de mesure ne sont pas résolues complètement.Les différents auteurs s'accordent néanmoins sur une tension interfaciale très basse,inférieure à I dyne /cm.(38).

L'établissement des isothermes d'adsorption des composants plasmatiques sur la membrane n'a malgré son intérêt,que rarement été étudié.

Conclusion

Les propriétés physicochimiques de la membrane sont susceptibles de varier avec le métabolisme cellulaire d'une part,avec la fixation de composants plasmatiques d'autre part.Elles doivent donc être essentiellement comprises comme le résultat instantané d'un équilibre dynamique
Ces propriétés sont directement responsables des liaisons intercelluleires. Compté tenu des propriétés membranaires ainsi dedinies ,il est intéressant

de voir si les énergies calculées précédemment sont compatibles avec la théorie de stabilité des colloïdes lyophobes.

CHAPITRE 6

VALIDITE DE LA THEORIE DE STABILITE DES COLLOIDES LYOPHOBES POUR LES LIAISONS INTERGLOBULAIRES

Les énergies de liaison sont très faibles Ells correspondent à des interactions actives à grande distance et sont très sensibles à la force ionique du milieu.Vues la nature et les propriétés physicochimiques de la membrane il est raisonnables d'envisager la théorie de stabilité des colloides lyophobes à ces liaisons (49, 48)

Cette théorie ne tient compte que des forces attractives de Van der Waals et des forces répulsives électrostatiques.

A)Forces répulsives électrostatiques.

Quelle que soit l'origine des charges superficielles des cellules,ces charges doivent être compensées par une charge d'espace égale et de signe opposé.La distribution des charges dans l'espace est directement liée à la force ionique du milieu .Cette distribution est un facteur majeur de stabilité.

A partir du modèle de la couche double de Gouy et Chapman,la théorie DLVO permet de déterminer quantitativement la valeur du potentiel répulsif.

En supposant le milieu homogène et continu,de constante diélectrique identique en tous points,ce qui est certainement faux près de la paroi, l'équation de potentiel pour une surface plane est la suivante(29,50,51):

$$\chi K = \ln \frac{\left[e^{\frac{Ze\psi}{2kT}} + 1\right]\left[e^{\frac{Ze\psi_0}{2kT}} - 1\right]}{\left[e^{\frac{Ze\psi}{2kT}} - 1\right]\left[e^{\frac{Ze\psi_0}{2kT}} + 1\right]}$$

ψ_0 :potentiel à la surface de la particule

x:distance à la surface

k:constante de Boltzmann

T:température absolue.

$$K = \left[\frac{8\pi e^2 \eta Z^2}{\varepsilon k T}\right]^{1/2}$$

e:charge de l'électron

η:viscosité du milieu

Z :valence des ions

ε :constante diélectrique du milieu.

A)Forces répulsives électrostatiques.

Quelle que soit l'origine des charges superficielles des cellules,ces charges doivent être compensées par une charge d'espace égale et de signe opposé.La distribution des charges dans l'espace est directement liée à la force ionique du milieu .Cette distribution est un facteur majeur de stabilité.

A partir du modèle de la couche double de Gouy et Chapman,la théorie DLVO permet de déterminer quantitativement la valeur du potentiel répulsif.

En supposant le milieu homogène et continu,de constante diélectrique identique en tous points,ce qui est certainement faux près de la paroi, l'équation de potentiel pour une surface plane est la suivante(29,50,51):

$$\chi K = \ln \frac{\left[e^{\frac{Ze\psi}{2kT}} + 1\right]\left[e^{\frac{Ze\psi_0}{2kT}} - 1\right]}{\left[e^{\frac{Ze\psi}{2kT}} - 1\right]\left[e^{\frac{Ze\psi_0}{2kT}} + 1\right]}$$

ψ_0 :potentiel à la surface de la particule

x:distance à la surface

k:constante de Boltzmann

T:température absolue.

$$K = \left[\frac{8\pi e^2 \eta Z^2}{\varepsilon k T}\right]^{1/2}$$

e:charge de l'électron

η:viscosité du milieu

Z :valence des ions

ε :constante diélectrique du milieu.

Dans l'approximation dite des bas potentiels($\psi_0 < 25$ mV),l'équation se simplifie et se confond avec l'approximation de Debye et Hucquel:

$$\psi_{(x)} = \psi_0 e^{-xk}$$

La signification physique de K est l'inverse de l'épaisseur de la double couche,elle-même definie par la distance à la particule où le potentiel à l'interface est réduit à 37% de sa valeur.

Pour des solutions aqueuses de 10^{-1} M de sels monovalents,cette épaisseur est de 10 Å.Elle est de 100 Å environ pour des solutions de 10^{-3} M.(50)

Quand deux particules de même charge entourées de leursdoubles couches s'approchent l'une de l'autre,les doubles couches se chevauchent partiellement.

Vervey et Overbeck ont calculé le potentiel répulsif pour deux surfaces planes,séparées par une distance bien plus grande que l'épaisseur de leur couche double.(50)(approximations pour les interactions faibles)

$$V_R = \frac{32 n k T \gamma^2}{\kappa} \left(1 - \tanh \kappa \frac{d}{2}\right)$$

$$\gamma = \frac{e^{\left(\frac{ze\psi_0}{2kT}\right)} - 1}{e^{\left(\frac{ze\psi_0}{2kT}\right)} + 1}$$

d :distance entre les surfaces

n :nnombre d'ions par centimètre cube

e :charge de l'électron

ε :constante diélectrique.

ψ_0 :potentiel de surface.

Pour Kd $\gg$ I(interaction à grande distance),on obtient l'équation classique des interactions faibles:

$$V_R = \frac{64 n k T \gamma^2}{\kappa} e^{-\kappa d}$$

d'où une force répulsive:

$$|F_R| = 64 n k T \gamma^2 e^{-\kappa d}$$

Dans le cas particulier des globules rouges supposés à faces parallèles,on peut admettre une épaisseur de la double couche de l'ordre de IO Å (4I,50),un potentiel de surface de -20 mV,La constante diélectrique du milieu peut être soit celle de l'eau(74),soit celle du plasma(I80).

B)Forces attractives

On considère ici que les forces de Van der Waals sont additives et que leur portée est beaucoup plus grande que les distances interatomiques.On néglige enfin les effets de retardation. Dans ces conditions,on a entre deux surfaces planes dans le vide:

$$V_{attractif} = -\frac{A}{12\pi d^2}$$

A:constante de Hamaker(en ergs)
d;distance entre les particules

La constante de Hamaker des particules tient compte de la densité superficielle des atômes constitutifs,et de leur vibration réciproque Les valeurs extrêmes calculées ou déterminées à partir des vitesses de coagulation,vont de 10^{-13} ergs pour AgI ou des particules de polystyrène,à10^{-15}ergs pour des gouttelettes de paraffine.Une valeur de 5.10^{-15} ergs a été proposée pour des globules blancs.(41)

L'énergie totale d'interaction est évidemment la somme des énergies répulsives et attractives.

$$V_t = V_a + V_r$$

Pour des colloides lyophobes,de nombreuses courbes représentant l'énergie totale d'interaction ou de la force en fonction de la distance,ont été décrites.(29,88).Pour différentes valeurs de la force ionique du milieu(et donc de la double couche),du potentiel superficiel à l'interface et de la valeur de la constante de Hamaker,ces courbes font habituellement apparaitre,à

une distance de plusieurs dizaines d'Angström,un minimum d'énergie libre attractif,séparé d'un éventuel premier minimum par une barrière de potentiel.(figure I5)
Pour des systèmes biologiques,l'énergie totale d'interaction pour différentes valeurs de la constante de Hamaker et du potentiel superficiel,est représentée sur la figure I6.(38)
On voit que pour des cellules plates ayant un potentiel de surface de -I5 mV,il existe à une distance de IIO Å environ,un second minimum ayant pour valeur IO^{-4} ergs par cm^2 avec $\mathcal{E}$ =74.Cette énergie totale est surestimée par la valeur de la constante diélectrique.
D'autres auteurs ont calculé l'energie totale d'interaction pour des particules sphériques de 5μ de diamètre et pour une valeur de la constant de Hamaker de IO^{-I4} ergs.Ils trouvent à 50 Å ,une énergie de 20 kT avec $\mathcal{E}$ =78.Avec $\mathcal{E}$ =I8O,ce second minimum attractif apparait à IOOÅ et prend pour valeur IOkT.
Comme celà a été recemment calculé,des globules rouges dans le plasma ayant un potentiel superficiel de -I8mV,une épaisseur de la double couche de IO Å ,une constante de Hamaker de IO^{-I5} ergs,dans un milieu de constante diélectrique I8O,présentent à une distance de IOOÅ environ une énergie d'interaction de I5,2 kT.Cette valeur est bien plus faible que celle précédemment trouvée par d'autres auteurs,mais les conditions expérimentales sont bien plus proches de la réalité(potentiel superficiel et constante diélectrique).

Ces dernières données numériques sont tout à fait compatibles avec nos résultats expérimentaux(W=II,27 kT)et correspondent à la distance interparticulaire vue au microscope électronique (IOO Å environ)

Ces faits appellent plusieurs remarques:

I)La bonne concordance des données théoriques et expérimentales,

amène à penser que non seulement la théorie DLVO puisse être applicable aux liaisons réversibles interérythrocytaires,mais encore que l'on puisse proposer comme valeur de la constante de Hamaker des globules rouges $A=10^{-15}$ ergs.
Cette valeur est du même ordre que celle déjà proposée pour des globules blancs(5.10^{-15}).

2)La théorie DLVO prévoit par cm^2 une énergie de liaison plus forte que celle expérimentalement déterminée.Mais notre donnée expérimentale a été la mesure de l'énergie de liaison effective,et l'energie par cm^2 a été calculée en supposant que toute la surface intervenait. Or il est hautement probable que vue la forme biconcave du globule d'une part,vue l'hétérogénéité superficielle de la membrane d'autre part,une partie seulement (50% ?) de la surface participe à ce type de liaison.

3)La comparaison des différentes courbes obtenues (48)en faisant varier les divers paramètres,a permis de constater que pour des surfaces planes,le second minimum est peu influencé par des modifications du potentiel de surface et par la température ,entre 0 et 40°.Par contre l'énergie attractive est fortement diminuée par une augmentation de la constante diélectrique du milieu et bien sûr augmente avec une élévation de la valeur de la constante de Hamaker.
Ceci permet de mieux préciser le rôle des différents agents pharmacodynamiques sur l'agrégation des globules rouges:
Trois faits paraissent essentiels:
-l'effet d'une modification faible du potentiel superficiel sous l'effet d'une adsorption,doit etre de peu d'importance sur l'agrégation.
-par contre cette adsorption peut,en modifiant la constante de Hamaker,considérablement déplacer la position et modifier la valeur du second minimum attractif.
-Enfin,indépendemment de toute adsorption membranaire,la modification de la constante diélectrique du milieu proche de la membrane,éloigne la position et diminue la valeur du second minimum.C'estnotamment le

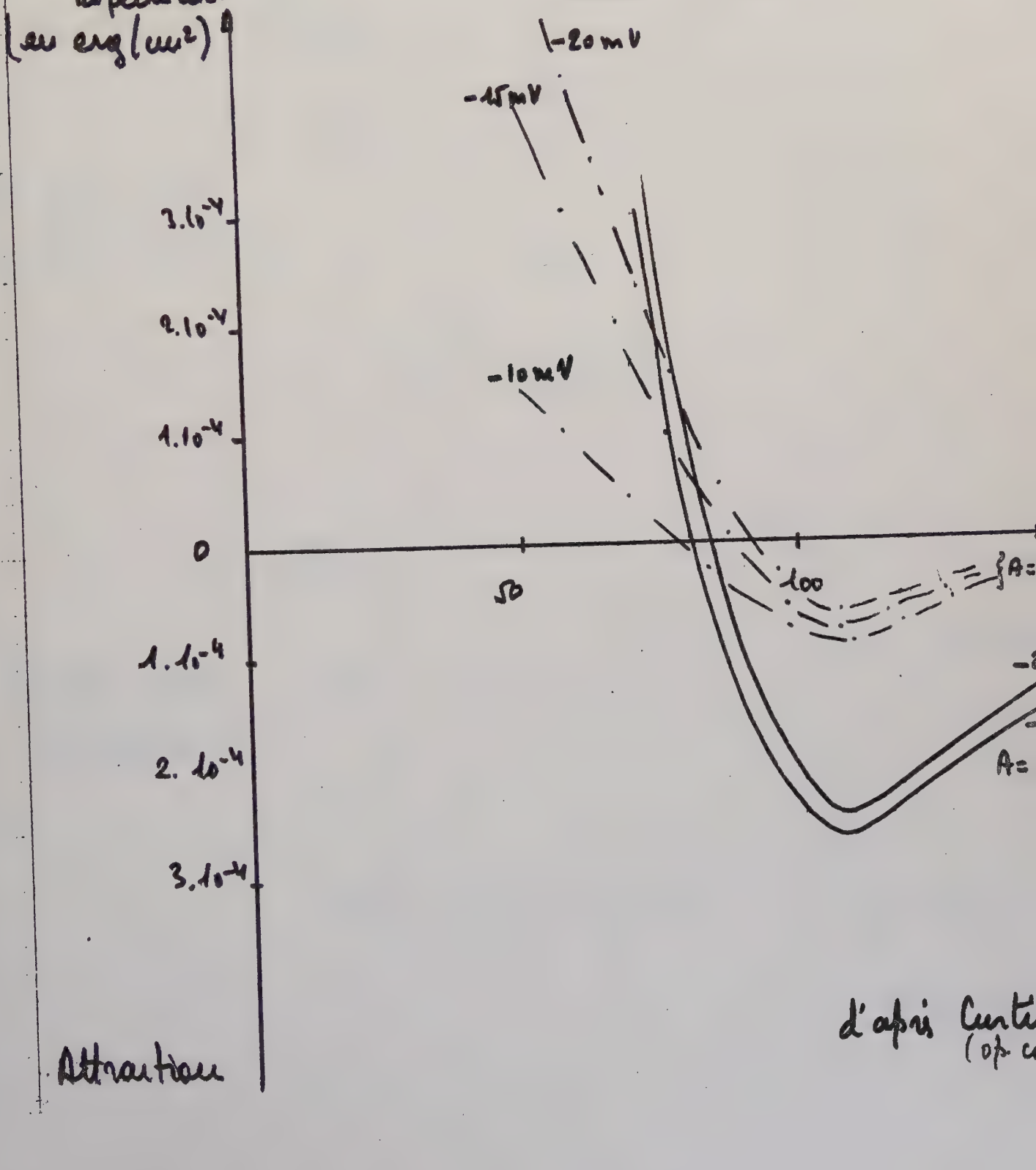
cas pour le Dextrane($\mathcal{E}$ =430)

Conclusion

L'application de la théorie de stabilité des colloides lyophobes aux énergies de liaison interérythrocytaires est compatible avec les données expérimentales.On est ainsi amené à proposer pour le globule rouge une constante de Hamaker de 10^{-15} ergs par cm^2. Cette valeur est très faible mais comparable à celle dejà proposée pour le globule blanc à partir d'autres techniques.

Fig 16

Allure générale des Courbes d'Energie tota
d'interaction entre deux particules pla



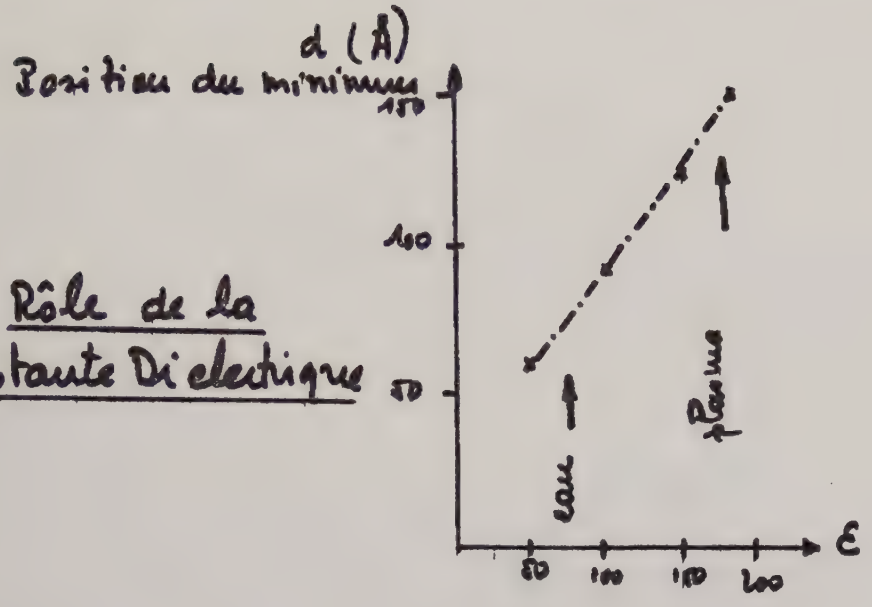
d'après Curti
(op. c

Fig 17.

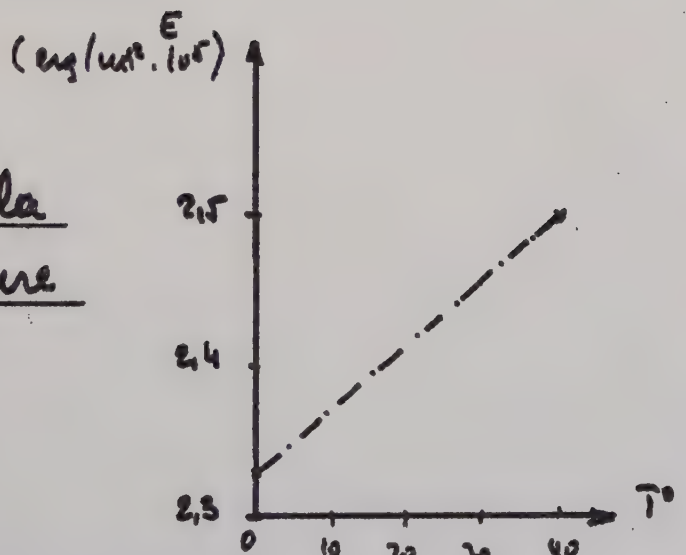
Influence de la Constante Dielectrique, et de la Température sur le second minimum

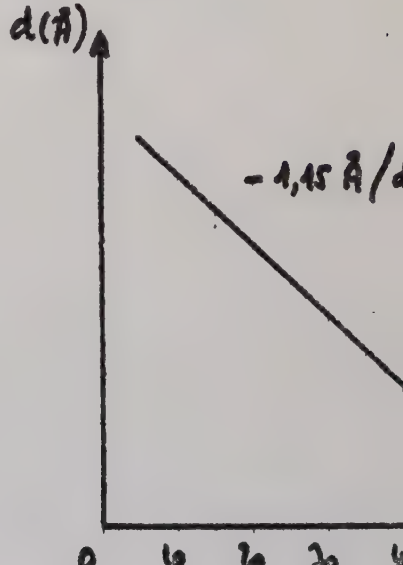
Position du minimum

ⓐ Rôle de la Constante Dielectrique



ⓑ Rôle de la Température





d'après Gui
(op. cit

II ème PARTIE

CONSEQUENCES RHEOLOGIQUES DES LIAISONS INTERGLOBULAIRES REVERSIBLES

Position du problème.

Les globules rouges sont capables de se lier les uns aux autres avec des énergies de liaison très faibles.Or les proprié-

tés rhéologiques des systèmes dispersés sont fortement modifiées par l'agrégation des particules en suspension.Ces modifications apparaissent essentiellement pour de très faibles taux de contrainte,analogues à ceux qui peuvent exister au niveau des microcirculations sanguines. Les liaisons réversibles interglobulaires sont-elles donc capables de modifier les conditions d'écoulement du sang dans les capillaires et si oui dans quelles proportions?

Nous verrons successivement le matériel employé pour cette étude,les résultats puis l'interprétation qui peut être proposée.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODE

A)Rappel de quelques notions de rhéologie sanguine.

La rhéologie du sang a depuis Poiseuille,fait l'objet de nombreux travaux qui se sont récemment multipliés compte tenu de l'intérêt considérable que de telles études présentent aussi bien pour l'étude des microcirculations que pour une meilleure connaissance des propriétés mécaniques des membranes globulaires.La mise au point de divers appareillages d'une sensibilité satisfaisante pour ce type d'étude rend désormais possible certaines études rhéologiques qui se rapprochent davantage des conditions physiologiques auxquelles sont soumis les globules dans les circulations capillaires.
Sur le plan théorique par contre les problèmes sont encore loin d'être résolus car il faudrait tenir compte simultanément:
-de la viscosité du milieu,le plasma dant le comportement newtonien

n'est pas certain aux très faibles taux de cisaillement(89)ce qui n'est pas surprenant vue la teneur en macromolécules dissymétriques.
-de la forme des particules en suspension
-de la concentration relative en particules supendues
-de la viscosité interne des cellules
-de la plasticité des membranes cellulaires qui transmettent plus ou moins facilement les contraintes du milieu extérieur au milieu intérieur
-del'état d'agrégation des particules entre elles(87)
-des liaisons éventuelles entre les rouleaux formés
-de l'orientation des rouleaux dans le champ d'écoulement
-de la température qui peut intervenir à plusieurs niveaux
etc....

Quand on sait que les études théoriques ne permettent actuellement de décrire que des solutions très diluées($<5\%$) de particules sphériques ou de moins de I% de particules dissymétriques,en suspension dans un milieu simple,on comprend le travail encore nécessaire.

Néanmoins de nombreuses solutions ont été proposées pour décrire à partir de données expérimentales,le comportement rhéologique des suspensions concentrées de particules pouvant s'agréger.

Ainsi Casson a proposé à partir de la rhéologie des encres d'imprimerie,une équation reliant la contrainte à la vitesse de déformation des suspensions pouvant s'agréger.
La majorité des auteurs admettent actuellement la validité de cette loi pour le sang.

$$\sigma^{1/2} = a\dot{\gamma}^{1/2} + b.$$

(Equation de Casson)

σ :contrainte
$\dot{\gamma}$:cisaillement
b :seuil de contrainte

Cette relation suppose que l'augmentation de la viscosité avec l'agrégation soit due à une séquestration de la phase continue :les particules agrégées constituent une maille dans laquelle le solvant reste partiellement lié;il en résulte une apparente augmentation du volume relatif des particules suspendues.
Cette relation fait apparaitre l'existence d'un seuil de contrainte, en deçà duquel il n'y a pas d'écoulement.
Enfin la loi de Casson établit une relation rapidement linéaire entre les racines carrées de la contrainte et de la vitesse de déformation imposée à la suspension.Les courbes classiques $\eta(\dot{\gamma})$ peuvent être remplacées par $\sigma^{1/2}(\dot{\gamma}^{1/2})$
De nombreux auteurs ont extrapolé à l'origine les valeurs obtenues pour des taux de cisaillement relativement élevé que leur permettaient leurs appareillages,en vue de déterminer les seuils de contraintes dont on concoit l'intérêt théorique et surtout pratique dans l'étude des sangs normaux et pathologiques.

Il importe de remarquer que l'utilisation de l'équation de Casson comme équation de comportement du sang n'est pas exempte de critiue :

-Il a d'abord été démontré que cette équation n'était pas applicable pour les suspensions concentrées(40%),où il pouvait exister des liaisons entre les agrégats formés,ce qui est justement le cas pour le sang(98,99)
-D'autre part,rien sur le plan théorique ne justifie la validité de l'extrapolation à vitesse nulle à partir de valeurs somme toute assez élevées(I sec^{-I}) des vitesses de cisaillement.On sait par ailleurs que des solutions de macromolécules concentrées(protéines,ADN) peuvent présenter un comportement newtonien,puis non newtonien,puis à nouveau newtonien quand les vitesses de cisaillement augmentant. (63,80)

Enfin l'équation de Casson décrit un comportement stationnaire,sans tenir compte des cinétiques d'agrégation ou de désagrégation des globules sous l'effet des forces interparticulaires ou des contraintes hydrodynamiques.

C'est pourquoi,connaissant par les études du pouvoir réflecteur,les cinétiques d'agrégation,lagranulométrie de la suspension et les énergies moyennes de liaison entre les globules,il nous a semblé intéressant de re reprendre cette étude rhéologique du sang,pour de très faibles vitesses de déformation et d'étudier en particulier les conséquences rhéologiques de l'agrégation réversible des globules rouges entre eux.

B)Matériel et Méthode

Nous avons utilisé un microviscosimètre rotatif(cylindre extérieur tournant)à cylindre coaxiaux.(figure I8,I9)(Chaix Méca constructeur,Nancy) Cet appareil permet de travailler dans une gamme de vitesse de cisaillement de 25 à IO^{-2} sec^{-I},avec une sensibilité excellente de IO^{-2} dynes par cm^2.

Les principales caractéristiques de cet appareil sont les suivantes:

-le plongeur central est entouré par un anneau de garde qui trempe dans la solution à étudier:les propriétés mécaniques du film superficiel qui se forme à l'interface n'interfèrent ainsi pas sur les mesures puisque le film mouille l'anneau de garde qui reste immobile et ne transmet donc pas au cylindre central les réactions mécaniques du film.

Les lectures des couples compensateurs sont réalisées par une methode de zéro:une source lumineuse L se réfléchit sur le petit miroir M et forme une image en I.Quand le noyau central est dévié de sa position d'équilibre lors de la rotation du cylindre externe ,la rotation du miroir déplace l'image.Un petit courant est alors envoyé dans le cadre mobile du galvanomètre,eton ramène ainsi l'image à sa position initiale. L'intensité compensatrice est directement proportionnelle au couple qui s'exerce sur le cylindre central par l'intermédiaire du liquide à étudier.On enregistre sur un galvanomètre l'intensité compensatrice pour des vitesses de rotation variables et donc des cisaillements variables.

En vue des études cinétiques,nous avons appliqué deux cellules en opposition sur l'imageI.
Ainsi,tout déplacement de l'image de part et d'autre de sa position d' équilibre est immédiatement compensé par un courant dans le cadre mobile qui ramène cette image à sa position d'équilibre.
A partir d'un état initial stable(par exemple repos depuis longtemps),on peut brusquement imprimer une vitesse de rotation fixe au cylindre externe et étudier en fonction du temps l'intensité compensatrice.De même,à partir d'une certaine rotation établie depuis longtemps,on peut brusquement interrompre la rotation du cylindre externe et étudier le couple résiduel en fonction du temps.
Cette façon de faire peut être réalisé pour des échelons rectangulaires progressivement croissants des vitesses de rotation.
Grace à ce dispositif,on peut donc réaliser l'analogue des expériences de relaxation,mais en phase liquide et en imposant non des déformations, mais des vitesses de déformation.

Les résultats obtenus avec du sang en fonction des vitesses de déformation et du temps sont shématisés sur la figure25.

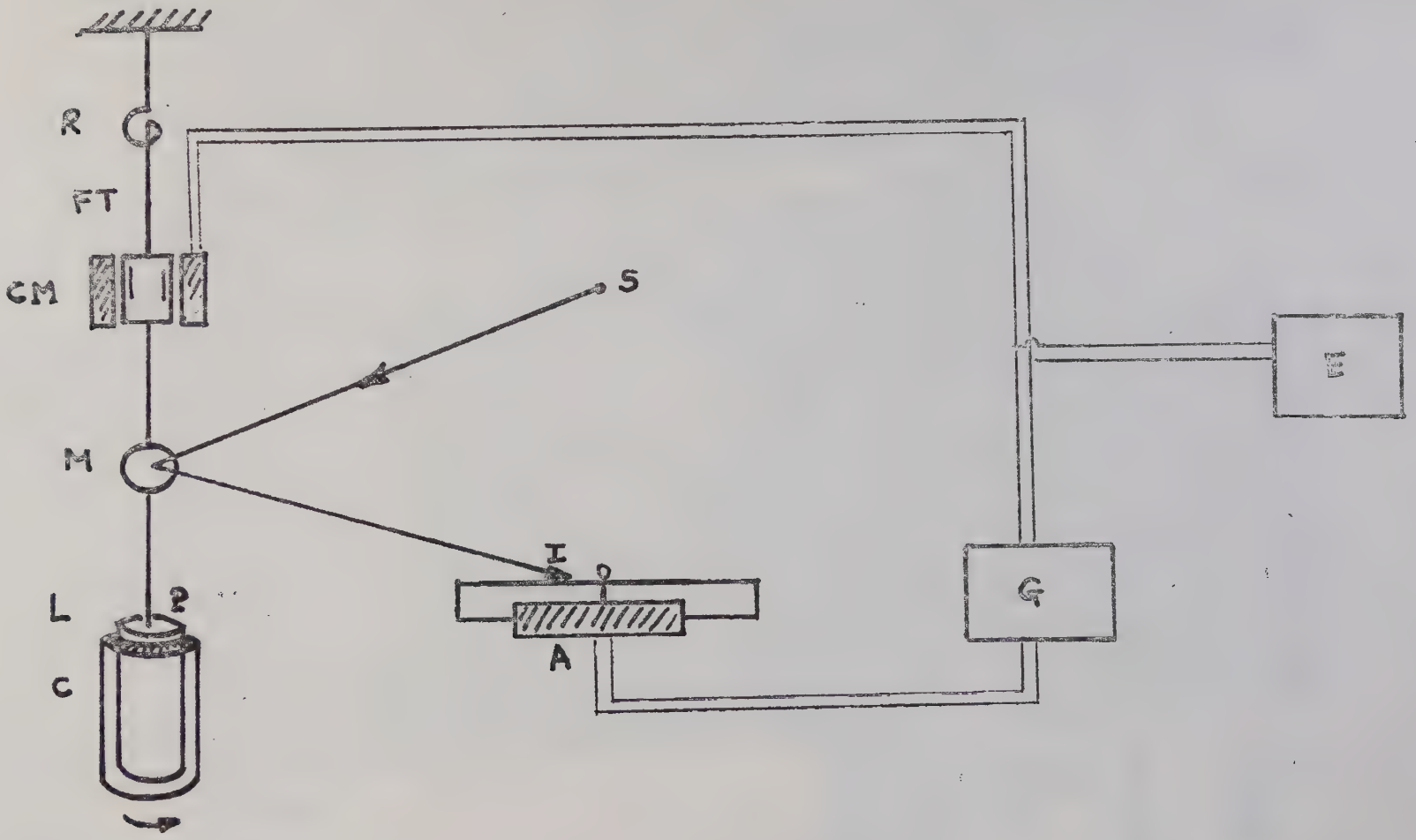
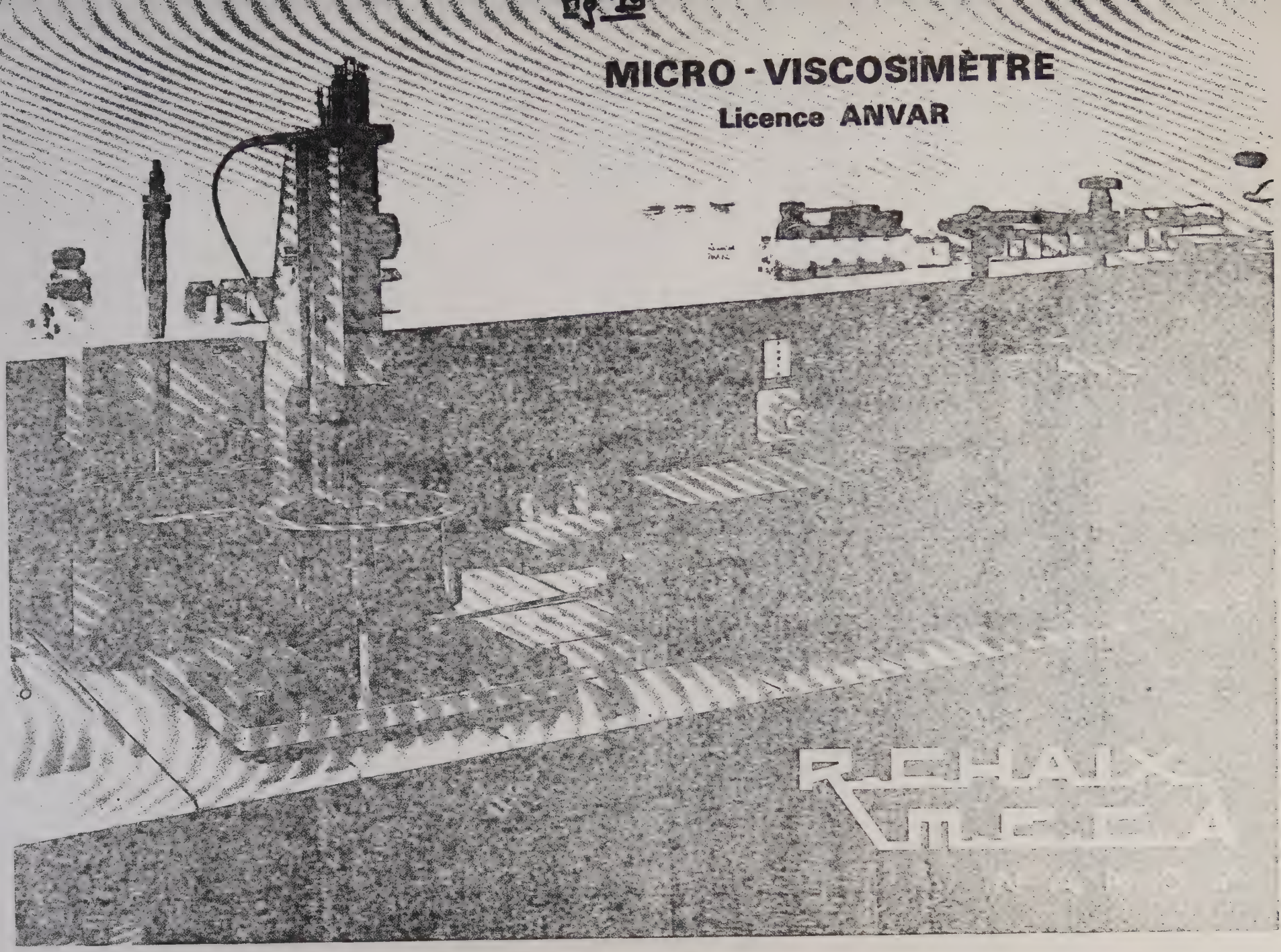


Fig 18.

MICRO - VISCOSIMÈTRE

Licence ANVAR



Les courbes obtenues permettent d'étudier à la fois les viscosités apparentes en régime d'écoulement stationnaire et l'évolution de ces viscosités sous l'effet de variations brusques des vitesses de cisaillement(régime transitoire

Le protocole d'expérience le plus usuel est le suivant:
-à partir d'une vitesse nulle depuis longtemps,on impose brusquement une vitesse de déformation constante et l'on suit à chaque instant la variation de l'intensité du courant compensateur.Celui-ci ayant atteint un équilibre,on arrête brusquement la rotation et on continue de suivre la variation du courant.
Ce protocole est employé pour des vitesses de rotation croissantes (multiple de 2) en commencant par des taux de cisaillement très faibles de 0,02 sec^{-1}.
Avant d'étudier le comportement du sang ,nous avons testé le montage avec des solutions newtoniennes étalons d'eau(I cp à 20°) et de glycérine (939 cp à 20°),en vue d'établir la correspondance entre les intensités compensatrices de courant et les contraintesà la surface du cylindre intérieur,exprimées en dynes par cm^2.(Fig 20,2I
Ces résultats permettent de constater que dans cette gamme de contraintes,les résultats ne sont pas perturbés par l'inertie mécanique de l'appareillage.

GLYCERINE. 98%...

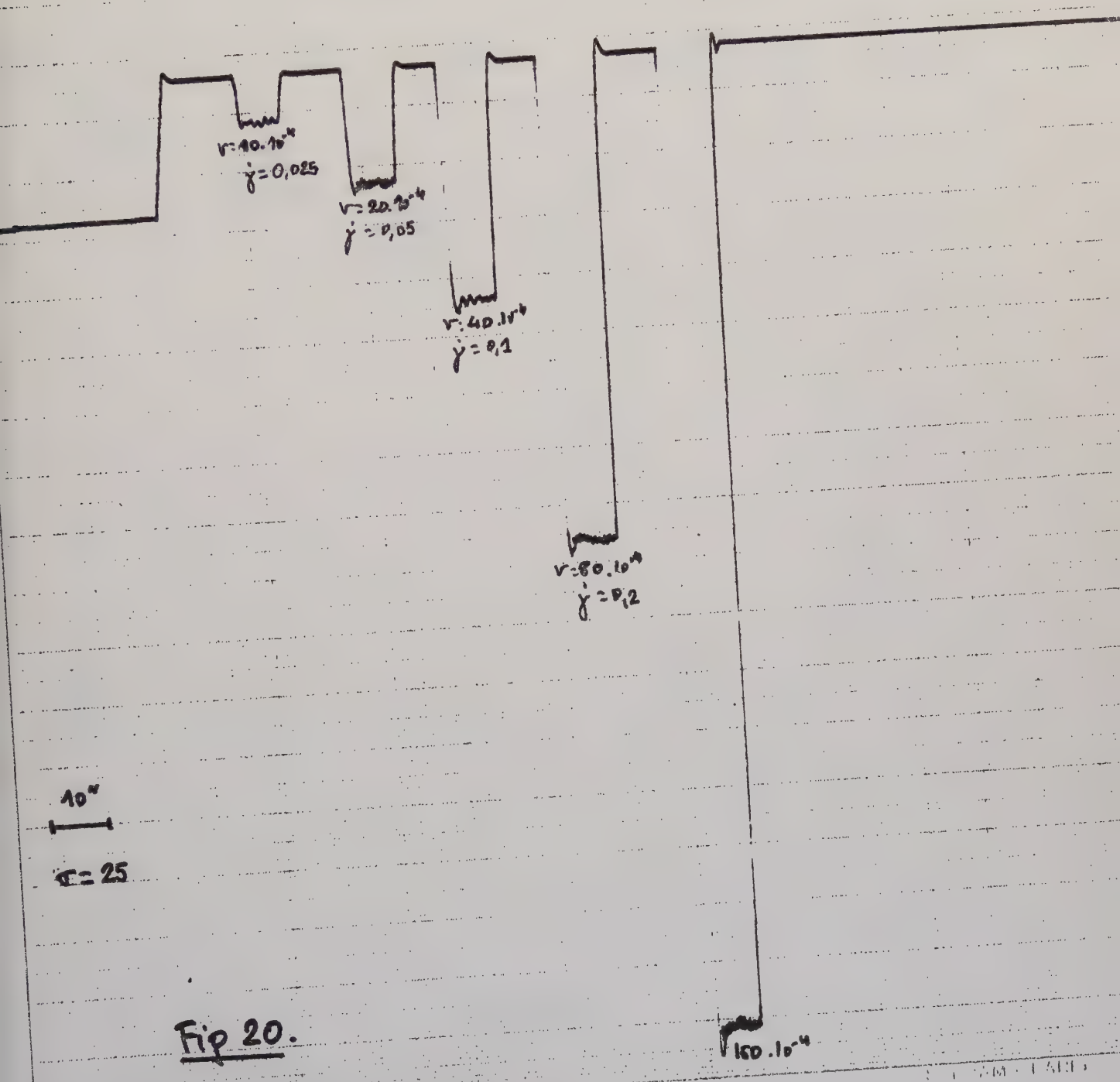


Fig 20.

EAU : 20° — $\eta = 1$ cp.

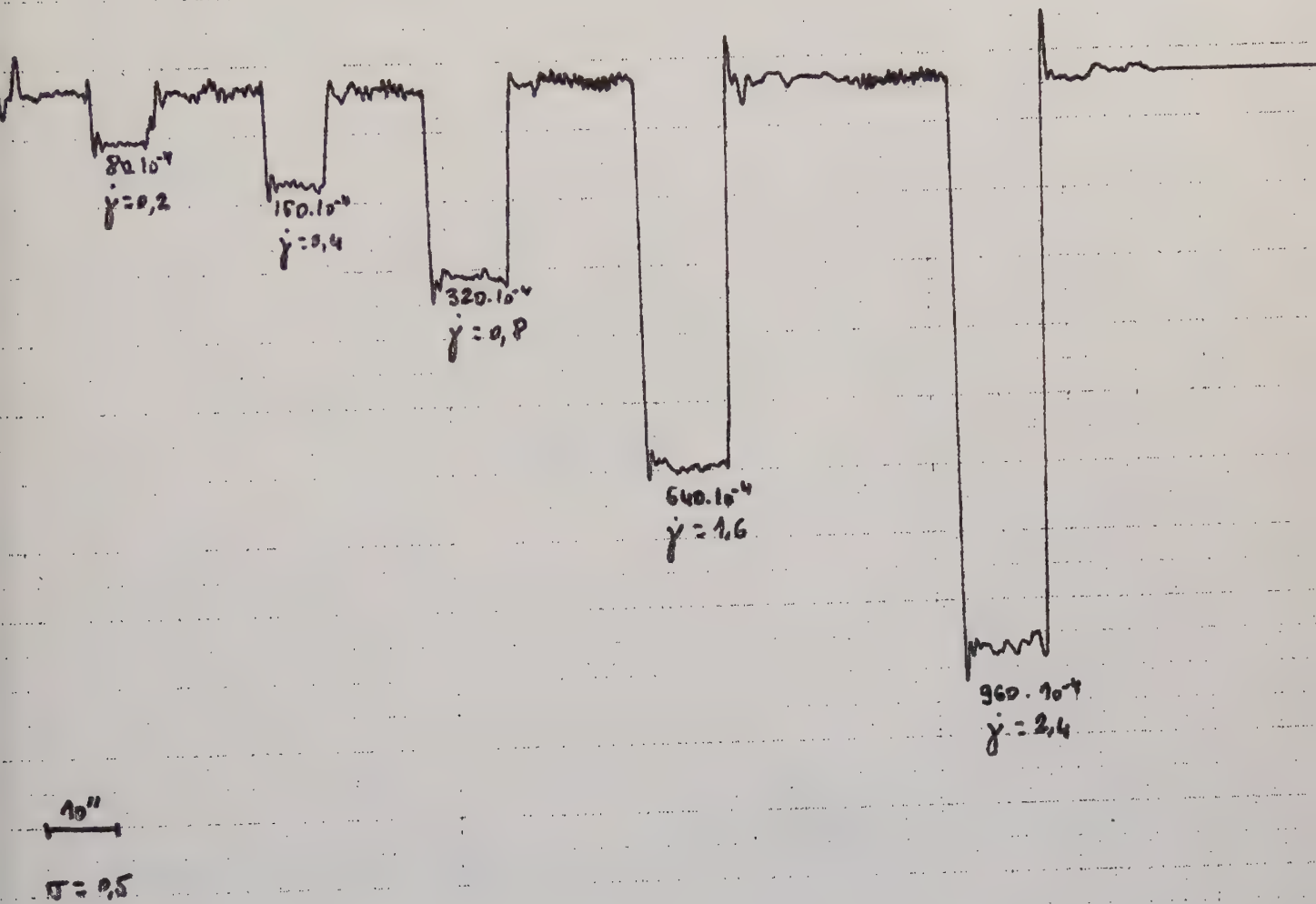


Fig 21

CHAPITRE 2

RESULTATS

Différents sangs normaux et pathologiques ont été étudiés par la technique qui vient d'être décrite.

Trois grandes catégories peuvent être définies:

-les sangs normaux($\frac{W}{kT}$=II)
-les sangs fortement agrégés(comme dans les maladies de Kahler ou par substitution d'une partie du plasma par des hauts polymères)(Energie moyenne de liaison par globule=20 kT environ)
-les sangs complètement désagrégés(par exemple par du salicylate ou par les dextranes de bas poids moléculaire)

Les données expérimentales permettent dedéterminer:
-d'une part les viscosités apparentes en régime stationnaire,qui peuvent être

exprimées en $\eta = f(\dot{\gamma})$ ou bien en $\sigma^{1/2} = g(\dot{\gamma}^{1/2})$ (Casson)

-d'autre part,les données permettent d'analyser les réponses dynamiques à un échelon rectangulaire de taux de cisaillement. L'aalure de cette réponse dynamique dépend du **taux** de cisaillement et trois zones peuvent être définies:

10^{-2} $sec^{-1} < \dot{\gamma} <$ 10^{-1} sec^{-1} (type I

10^{-1} $sec^{-1} < \dot{\gamma} <$ 1 sec^{-1} (typeII

10^{1} $sec^{-1} < \dot{\gamma}$ (type III

Les principaux résultats expérimentaux sont réproduits sur les figures 22,23,24,25.
Dans la première zone;les contraintes sont progressivement croissantes et se stabilisent à un plateau.
Dans la deuzième zone,les contraintes sont immédiatement importantes et décroissent progressivement jusqu'à atteidre un état d'équilibre.
Dans la troisième zône,la réponse est analogue à celle obtenue avec des solutions newtoniemnes pures:la contrainte atteint d'emblée son maximum et s'y stabilise.
L'analyse détaillée des courbes sera faite ultérieurement.
La première remarque que l'on puisse faire est que les résultats diffèrent notablement pour des sangs agrégés et pour des sangs complètement dissociés.

A)Sangs normalement agrégés:

La transcription des viscosités apparentes à l'état stationnaire selon la loi de Casson rend bien compte du comportement rhéologique de tous les sangs pour des taux de cisaillement relativement élevés($\dot{\gamma} > 5.10^{-2}$)

Par compte nous avons plusieurs fois noté que les sangs caractérisés par des variations de pouvoir réflecteur faibles donc par des énergies d'associaiton faibles,présentaient un comportement newtonien aux très faibles taux de cisaillement qui ne pouvait plus être décrit par la loi de Casson.Ces faits sont à rapprocher du comportement rhéologique des suspensions complètement dispersées que nous verrons plus tard,mais ils ont déjà une conséquence immédiate:

Il est en effet classique d'extrapoler à l'origine la droite de Casson en vue de déterminer le seuil de contrainte des suspensions.Cette extrapolation est réalisée à partir de la valeur minimale habituellement obtenue avec les viscosimètres usuels donnant des taux de cisaillement de I sec^{-I} environ.La non linéarité de la relation $\sigma^{1/2} = f(\dot{\gamma}^{1/2})$ en deçà de cette valeur retire toute justification à cette façon de faire.

C'est peut être ce qui explique en partie la grande disparité des résultats obtenus par les différentes techniques de mesure des seuil de contrainte (9I)(2.10^{-3} à 5.10^{-I} dynes par cm^2).

Par ailleurs l'équation de Casson ne rend pas compte de la réponse dynamique du sang à un échelon rectangulaire de vitesses de cisaillement. Cette réponse est shématisée sur la figure 25 qui représente la variation de la contrainte pour des crénaux de vitesse de cisaillement.

Dans chacune des zones,il faut considérer la réponse à l'établissement et à la suppression de la contrainte.

A l'établissement de la contrainte,l'allure ces courbes a déjà été décrit qualitativement.A la suppression de la contrainte,les intensités compensatrices reviennent plus ou moins lentement à la valeur de base en fonction des taux de cisaillement initiaux.Les valeurs des intensités finales obtenues sont égales à celles précédent l'établissement du taux de cisaillement:il n'existe pas d'intensité residuelle,quelle que soit la vitesse de rotation.

B)Sangs complètement dissociés

Les variations des viscosités apparentes en régime stationnaire et en régime transitoire des sangs complètement dispersés,sont représentées sur les figures 26,27.
On voit que:
Aux très faibles taux de cisaillement,les viscosités en régime stationnaire sont indépendantes des taux de cisaillement: le comportement est donc newtonien dans cette zône.Par ailleurs ,à concentration égale,la viscosité apparente est 5 à IO fois plus faible que celle des sangs agrégés.
On retrouve donc un comportement déjà noté pour certains sangs normaux faiblement agrégés,pour lesquels nous avions critiqué la validité de l'extrapolation à l'origine pour déterminer le seuil de contrainte.
Pour des taux de cisaillement plus élevés,la réponse n'est plus newtonienne et le comportement est comme pour les sangs agrégés rhéofluidifiant.
Enfin au delà de IO sec^{-I} le comportement est à nouveau indépendant de vitesses de déformation et newtonien.

Dans ces conditions on voit qu'une suspension concentrée de particules dissymétriques complètement dissociées présente pour des vitesses de cisaillement croissantes,un comportement newtonien,puis rhéofluidifiant puis à nouveau newtonien.
Quelle est l'origine de ce comportement rhéofluidifiant?Deux hypothèses sont possibles:
-ou bien une orientation des particules dans le champs d'écoulement intervient:ce fait est classique et exploité dans les expériences de biréfringences d'écoulement.
-ou bien intervient une migration axiale des particules en suspension lors de l'écoulement.
Nous reviendrons sur ces hypothèses au chapitre suivant.

Quelle que soit la signification physique du phénomène la comparaison du comportementen régime permanent,des sangs normalement agrégés et dissociés permet de juger de l'importance rhéologique de cette agrégation.
La comparaison des réponses dynamiques est encore plus instructive:
En effet on constate que:
-à très faible taux de cisaillement,la réponse dynamique est du même type que pour les sangs normaux,mais avec des viscosités apparentes beaucoup plus faibles.
-vers $\dot{\gamma}=IO^{-I}$ sec^{-I},la réponse est par compte complètement différente:le pic

suivi d'une redescente a disparu et seul persistent les courbes du premier type.

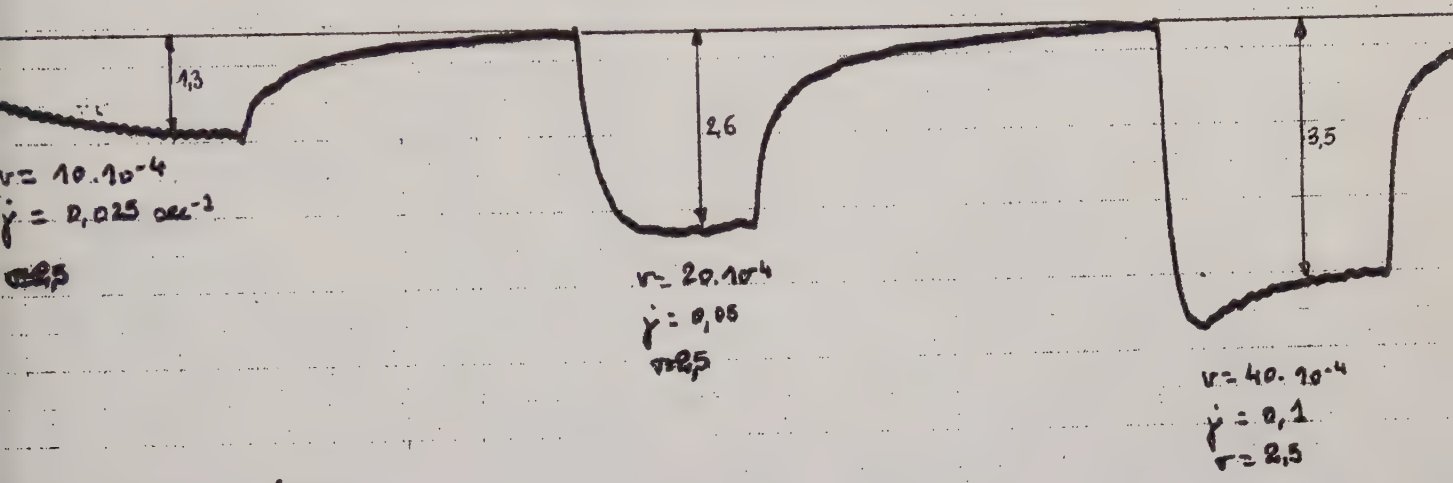
-vers $\dot{\gamma} = 10\ sec^{-1}$, les réponses se rapprochent de celles obtenues pour des solutions étalons newtoniennes, comme dans le cas des sangs normalement agrégés.

L'influence de l'agrégation peut alors être mieux précisée:

Aux très faibles taux de cisaillement, les viscosités apparentes à l'état stationnaire sont considérablement augmentées par l'agrégation des particules. A taux de cisaillement constant cette augmentation croit avec le degré d'agrégation des particules et donc avec les énergies de liaison interpaticulaires. Ceci n'exclut pas qu'il existe une valeur limite du taux de cisaillement en deçà de laquelle le taux de cisaillement peut redevenir newtonien pour les sangs faiblement associés.

Les réponses dynamiques du premier type (viscosité apparente progressivement croissante avec le temps jusqu'à un plateau) existent quelle que soit l'agrégation pour des taux de cisaillement très faibles. Par contre les réponses du deuxième type (pic puis redescente lente) - expression directe de la thixotropie, ne sont retrouvées vers $\dot{\gamma} = 10^{-1}\ sec^{-1}$ que pour les sangs agrégés. Cette réponse disparait des sangs complètement dissociés.

Les sangs agrégés ou non ont des réponses analogues pour des taux de cisaillement supérieurs à $10^{1}\ sec^{-1}$.



aug 5 jours 1/ ACD
lt : 45%
°: 20°

Fig 22

sang 5 jours % ACD

Fig 23
($\dot{\gamma} \simeq 10^{-1}$)

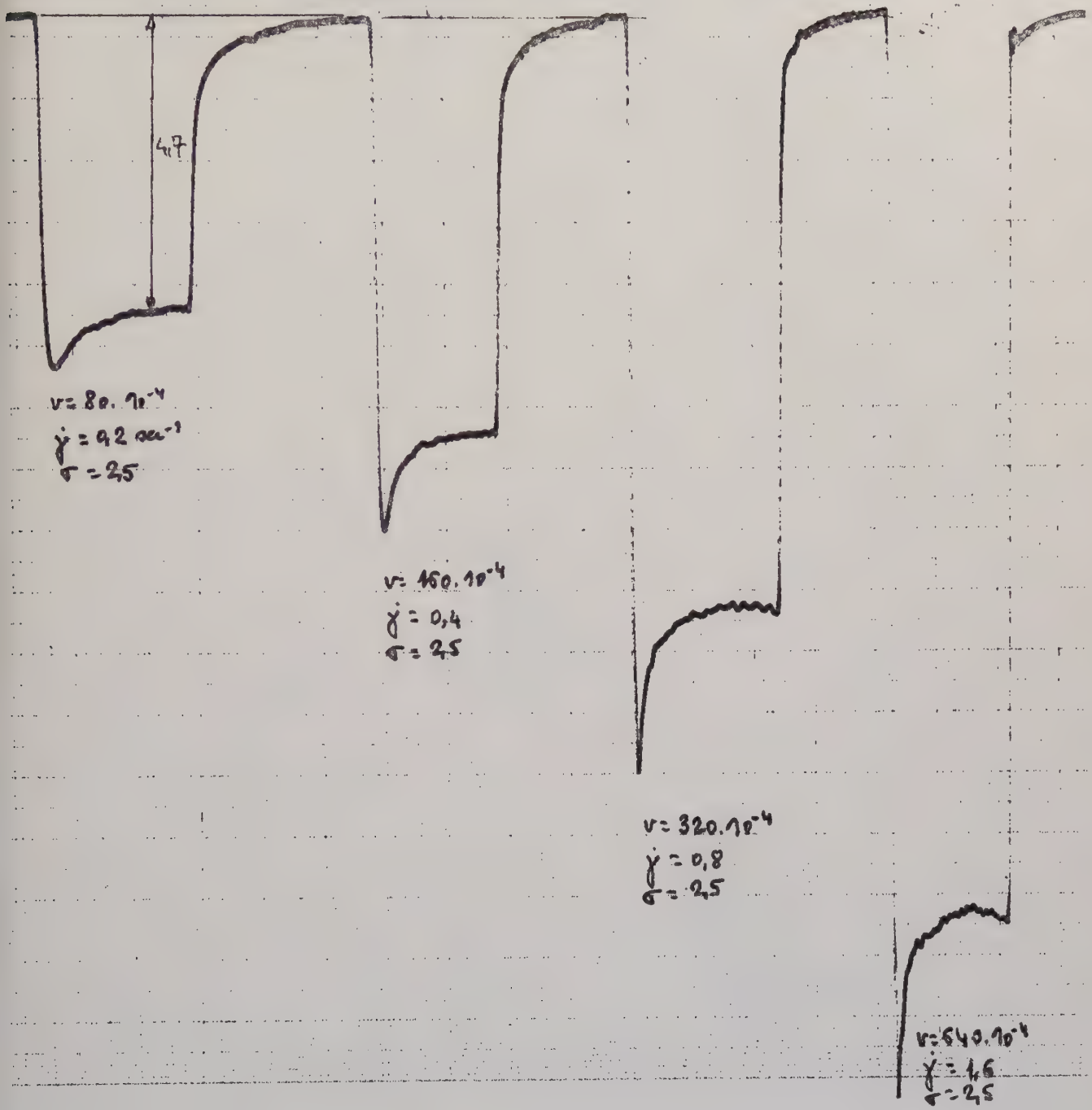
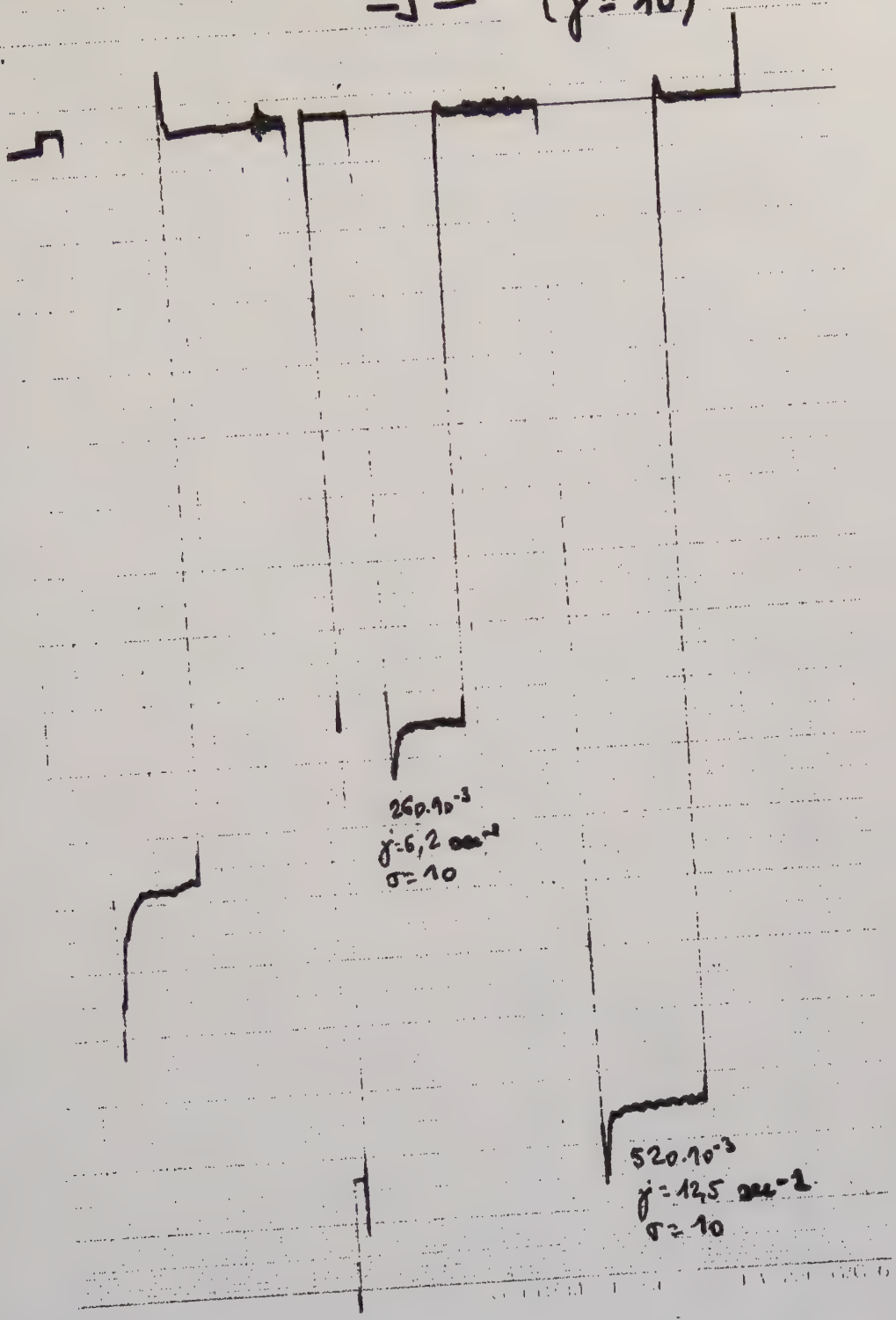


Fig 24 ($\dot{\gamma} \simeq 10$)



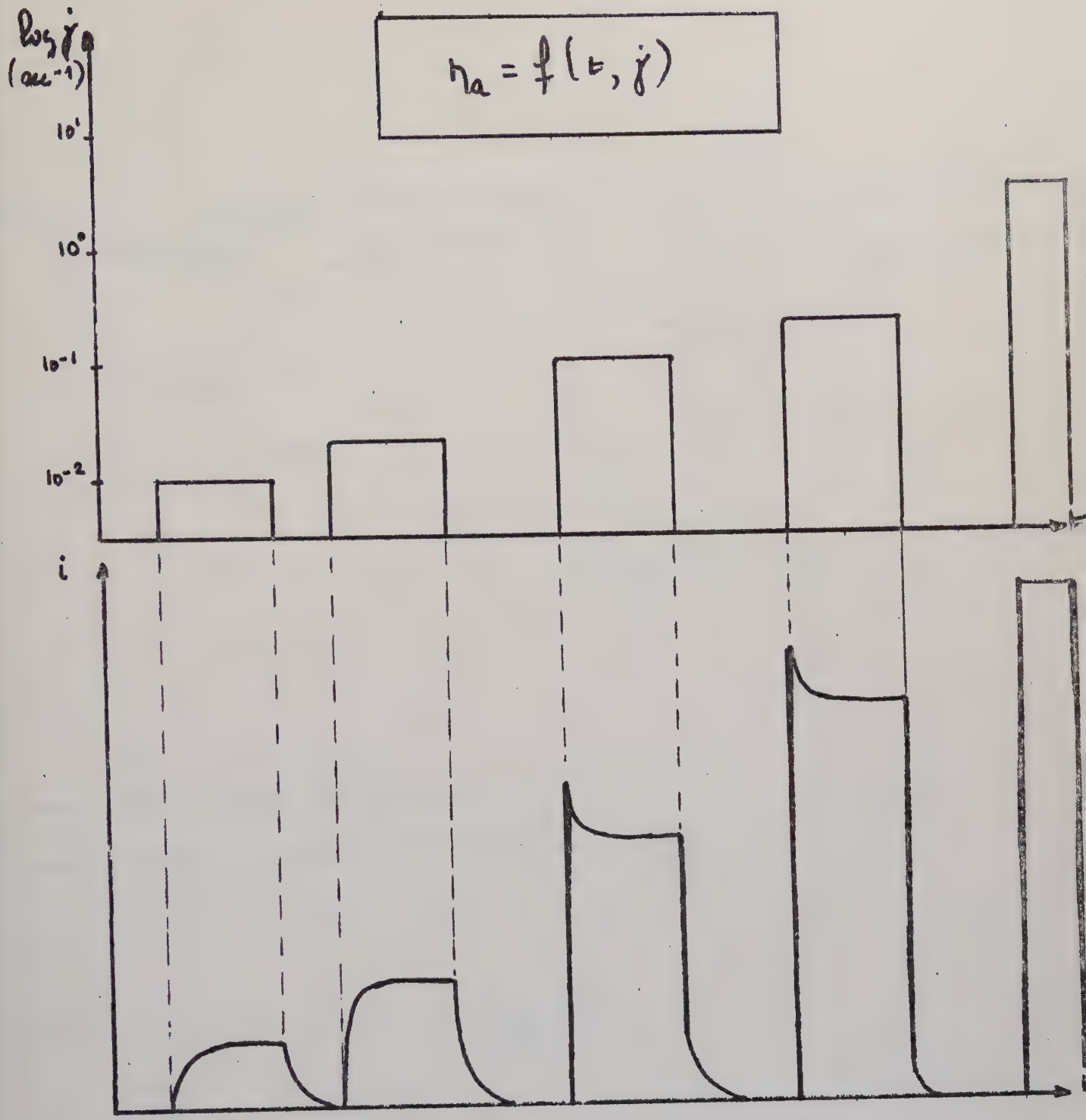
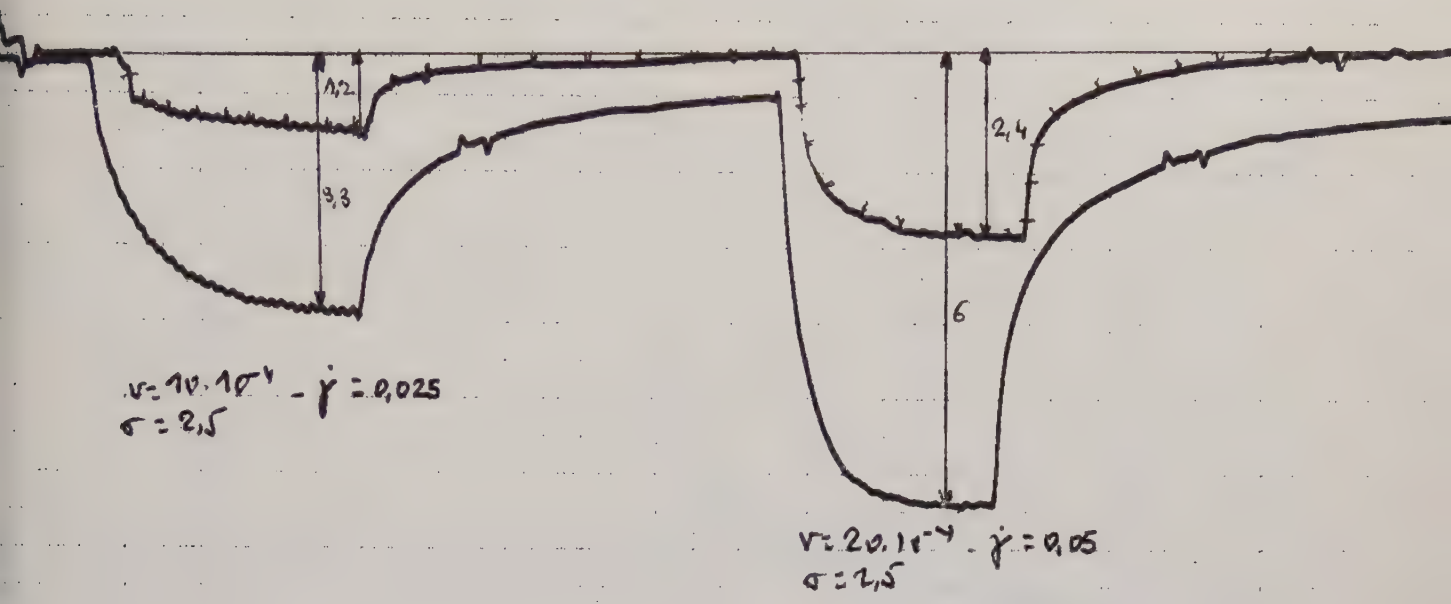


Fig 25

Rôle de la dissociation des globules



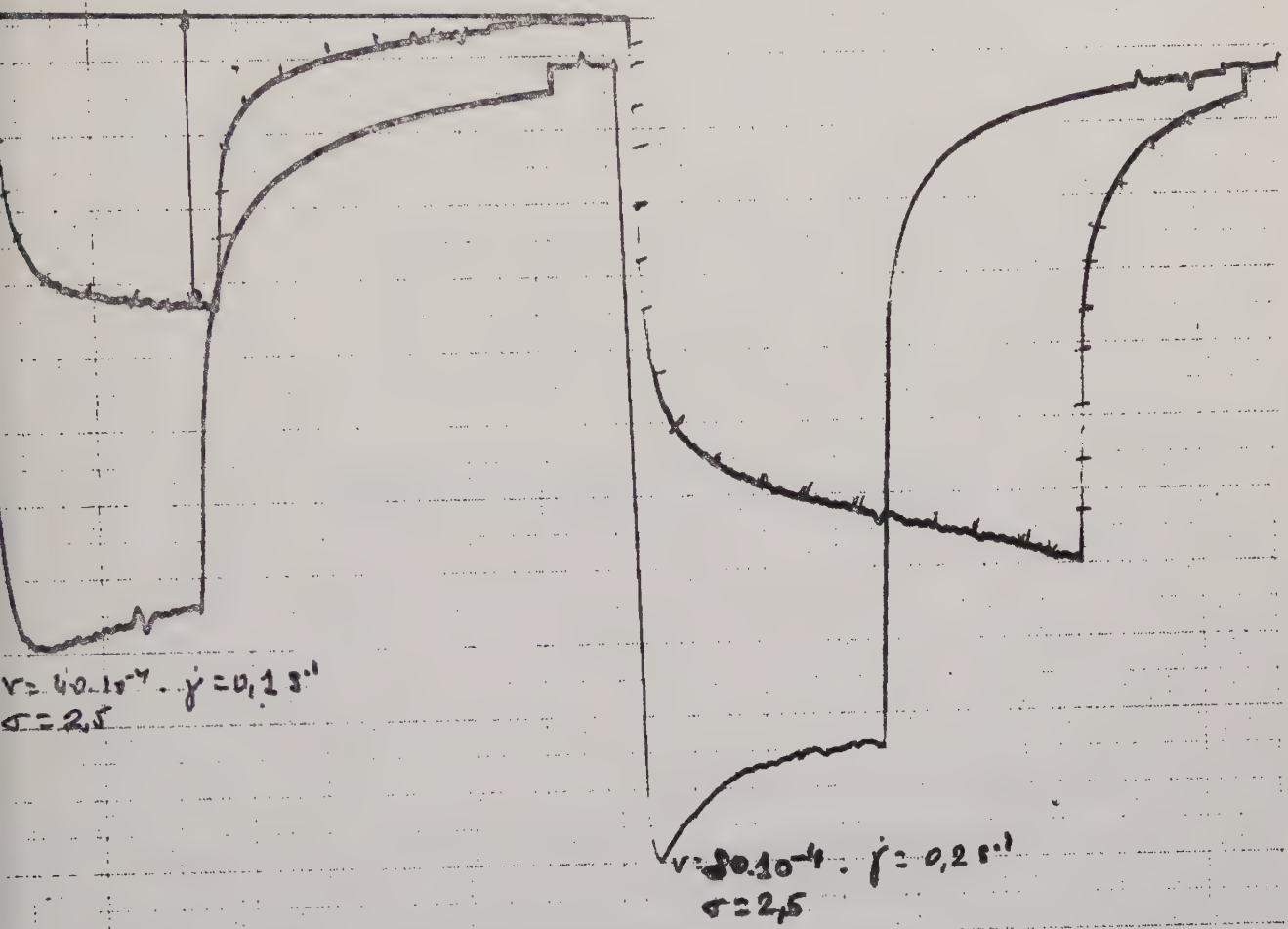
—— : sang dans le plasma

+++ : sang + salicylate (0,25 cc/4 cc)

10"

Fig 26

Rôle de la dissociation des globules



——— : sang dans le plasma

_ _ _ : sang + salicylate (0,25 g/kg)

Fig 27

CHAPITRE III

DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La complexité des résultats expérimentaux qui viennentd'être exposés,conséquence en particulier du caractère labile des rouleaux et du caractère non linéaire de certaines lois de comportement rhéologique,ne permettent évidemment pas de proposer un modèle mécanique simple et unique qui permette de rendre compte du comportement global de la suspension sanguine.

Néanmoins les différents types de courbe $\eta = f(t)$ peuvent être comparés du point de vue des analogies formelles avec des comportement connus.Certaines interprétations physiques peuvent ainsi être proposées au moins qualitativement.

Dans le domaine des très faibles taux de cisaillement,la variation en fonction du temps de la viscosité apparente pour des échelons de durée limitée(régime

transitoire),peut,en première approximation,être représentée par une fonction de la forme:

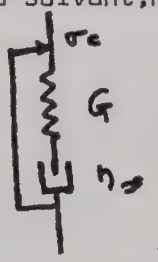
$$\eta_{(t)} = \eta_\infty \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right)$$

où la constante de temps,homogène à un temps,peut être assimilée à un temps de retardation apparent.Ainsi pour une valeur donnée de $\dot{\gamma}$,le liquide se comporte approximativement comme un liquide de Maxwell,de coefficient de viscosité η_∞ et de module d'élasticité $G_1 = \frac{\eta_\infty}{\tau_1}$ .Mais on constate que contrairement aux corps de Maxwell,le sang voit sa constante de temps diminuer quand les taux de cisaillement augmentent.

Ainsi pour $\dot{\gamma} = 5.10^{-2}\ sec^{-1}$ $\tau_1 = 3,6$ secondes

pour $\dot{\gamma} = 10^{-1}\ sec^{-1}$ $\tau_1 = 2,9$ secondes (voir figure 22).

Le modèle qui conviendrait n'est donc pas un liquide de Maxwell,mais un pseudo liquide de Maxwell,qui compte tenu du seuil de contrainte,peut être représenté par le shéma suivant,mais avec $\eta_\infty = f(\dot{\gamma})$, $\frac{\eta_\infty}{G_1} = h(\dot{\gamma})$



Pseudo liquide de Maxwell

Il importe d'insister sur le fait qu'il ne s'agit que d'une analogie formelle n'impliquant aucune hypothèse sur le mécanisme réel du phénomène observé.

De même après arrêt de la rotation,la courbe de relaxation est en première approximation décrite par la fonction:

$$\eta_{(t)} = \eta_\infty e^{-t/\tau_2}$$

Néanmoins η_∞ n'est pas une constante absolue du système, mais correspond à la valeur de la viscosité apparente pour un taux de cisaillement donné. La constante de temps τ_2 est différente de τ_1 mais diminue également quand les $\dot{\gamma}$ augmentent. Ainsi qu'on l'a vu précédemment à la valeur près de η_∞ le comportement des sangs complètement dissociés est du même type que celui des sangs normaux; les constantes de temps sonttoutefois nettement plus petites:

Sang normal — Sang dissocié

Dans la zone des vitesses de cisaillement de l'ordre de 10^{-1} sec^{-1}, les courbes de contrainte pour les sangs normaux présentent un pic puis une redescente, permettant d'étudier la thixotropie du système en fonction des taux de cisaillement. Pour une valeur donnée de ce dernier, on constate qu'à partir d'une valeur suffisemment grande de t, la décroissance de la viscosité apparente peut approximativement être décrite par une monoexponentielle décroissante de constante de temps τ_3:

$$\eta(t) = \eta_2 \, e^{-\frac{t - t_0}{\tau_3}}$$

pour $t > t_0$, t_0 étant le temps pour lequel η est maximum.
La valeur de la constante de temps diminue également quand les taux de cisaillement augmentent. C'est ainsi que pour:

Dans ces conditions on peut proposer de décrire la courbe expérimentalement obtenue pour η par une expression de la forme (tout au moins en dehors de la région du pic):

$$\begin{cases} \eta(t) = \eta_1 \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) + f \\ \qquad t < t_0 \,, \quad f = \eta_1 \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) \\ \qquad t \geqslant t_0 \,, \quad f = \eta_2 \, e^{-\frac{t - t_0}{\tau_3}} \end{cases}$$

$$\begin{cases} t \to \infty \,, & \eta_\infty = \eta_1 \\ t \to t_0 \,, & \eta = 2\eta_1 \left(1 - e^{-\frac{t_0}{\tau_1}}\right) = \eta_1 \left(1 - e^{-\frac{t_0}{\tau_1}}\right) + \eta_2 \end{cases}$$

$$\eta_2 = \eta_\infty \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right)$$

d'où : $t < t_0$, $\eta(t) = 2\eta_\infty \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right)$

$t > t_0$, $\eta(t) = \eta_\infty \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) + \eta_\infty \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_3}}$

Cette présentation appelle plusieurs remarques:
Cette expression intéresse les trois types de courbes expérimentales,mais dans la région des faibles taux de cisaillement, le deuxième membre de l'équation est nul.Dans la zone des taux de cisaillement élevés,la constante de temps est très petite et le liquide parait newtonien.Différentes valeurs des trois constantes de temps sont représentées sur le tableau ci contre; pour des sangs agrégés et des sangs dissociés.

La forme des différents termes des équations précedentes évoque évidemment des modèles électriques,mais l'analogie n'est pas suffisante pour interpréter le comportement et comprendre les mécanismes en cause,à l'échelle des globules ou des molécules.Il importe plutot de rechercher des correspondances entre les termes de l'équation et des états connus de la suspension étudiée.

On peut supposer que le terme en $\left(1 - e^{-t/\tau_1}\right)$,présent avec ou sans agrégation,représente.soit l'orientation des globules ou des rouleaux dans le champs d'écoulement sous l'effet simultané des contraintes de cisaillement et du mouvement brownien de rotation(I02,I03),soit une migration axiale des hématies ainsi que l'ont suggéré certains auteurs(98,99)sans qu'une preuve expérimentale formelle ait été jusqu'à présent apportée.
Le terme en $e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_3}}$ qui tend vers I quand les taux de cisaillement sont élevés,il pourrait représenter la dissociation des rouleaux sous l'effet du cisaillement.Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que la valeur de la vitesse de cisaillement pour laquelle ce terme devient appréciable est justement 0,4 sec^{-1} ,valeur qui correspond au seuil de contrainte nécessaire pour commencer à désagréger les rouleaux(voir Ière partie ,Ch. 4)

La part de l'agrégation dans le comportement rhéologique global du sang est donc le suivant:
-l'agrégation augmente la viscosité apparente à l'état stationnaire pour

pour les faibles vitesses de cisaillement

-elle élève les seuils de contrainte à partir desquels le sang commence à s'écouler

-elle est entièrement responsable de la thixotropie du sang

-elle n'est que partiellement responsable du caractère rhéofluidifiant

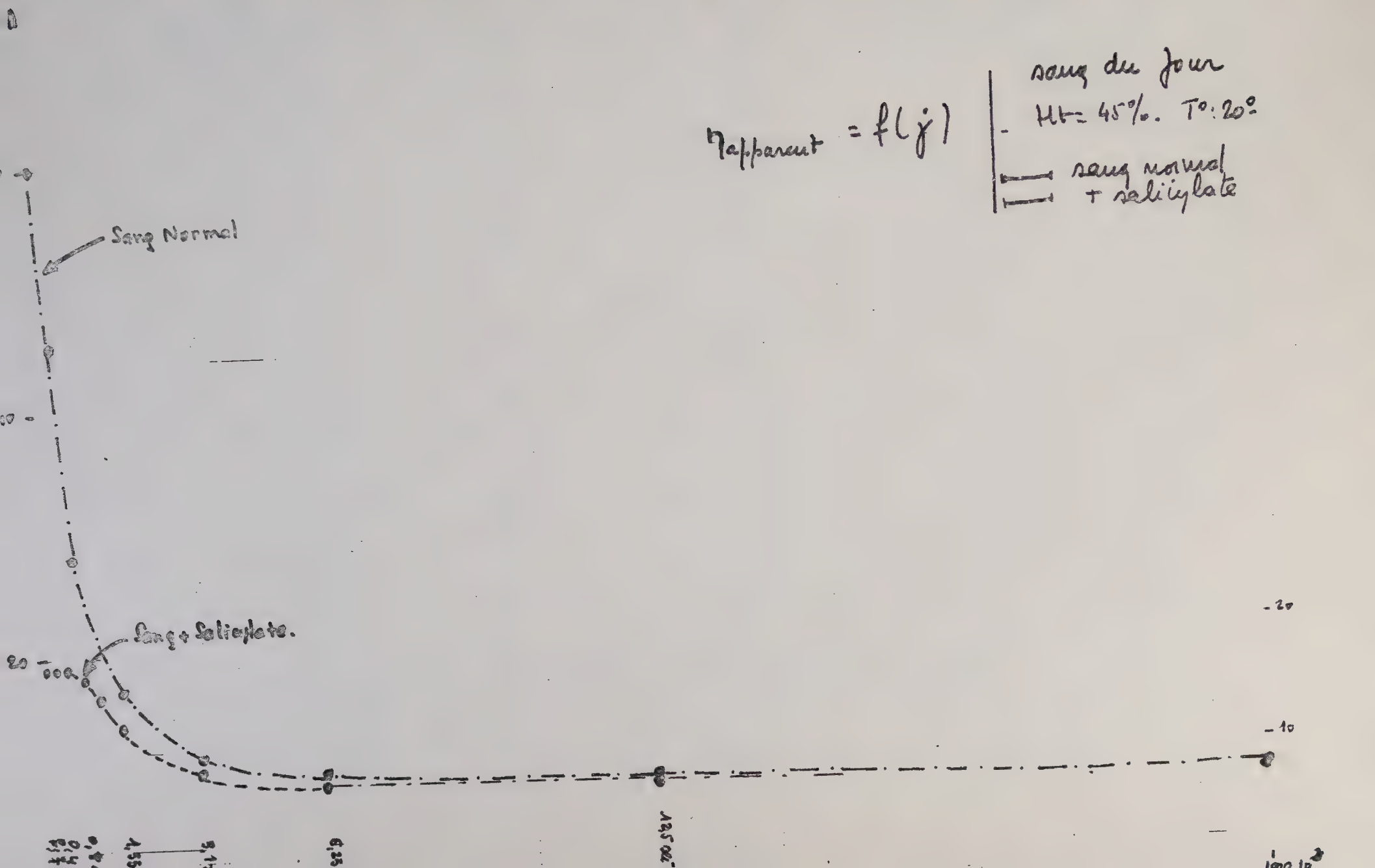
Il resterait à faire l'analyse théorique fine de chacun des processus envisagés ci dessus,mais cela dépasse le cadre de cette étude expérimentale.

Fig 28.

Etude des Réponses dynamiques.

	$\dot{\gamma}$	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8 sec^{-1}
Sang Nel	$T_{1/2}$	7"	5"2				
	λ_1	0,1	0,3				
	ε_1	10	3				
	$T_{2/2}$	5"	3"	1,5"	1"	0,8"	0,5"
	λ_2	0,14	0,23	0,46	0,69	0,87	1,3
	ε_2	7,1	4,35	2,15	1,42	1,15	0,7
	$T_{3/2}$			6	4	2	
	λ_3			0,11	0,17	0,34	
Sang Dessalé	ε_3			8,9	5,9	3	
	$T_{1/2}$	2"	1,5"	1"			
	λ_1	0,34	0,46	0,69			
	ε_1	2,9	2,15	1,44			
	$T_{2/2}$	—	—	—			
	λ_2	—	—	—			
	ε_2	—	—	—			
	$T_{3/2}$	2"	1,5"	1"			
	λ_3	0,34	0,46	0,69			
	ε_3	2,9	2,15	1,44			

Fig 29


$\eta_{apparent} = f(\dot{\gamma})$
sang du jour
Ht = 45%. T°: 20°
sang normal + salicylate
Sang Normal
Sang + Salicylate.
20
10

$$\tau^{1/2} = (\beta\dot{\gamma})^{1/2} + b$$

(Casson)

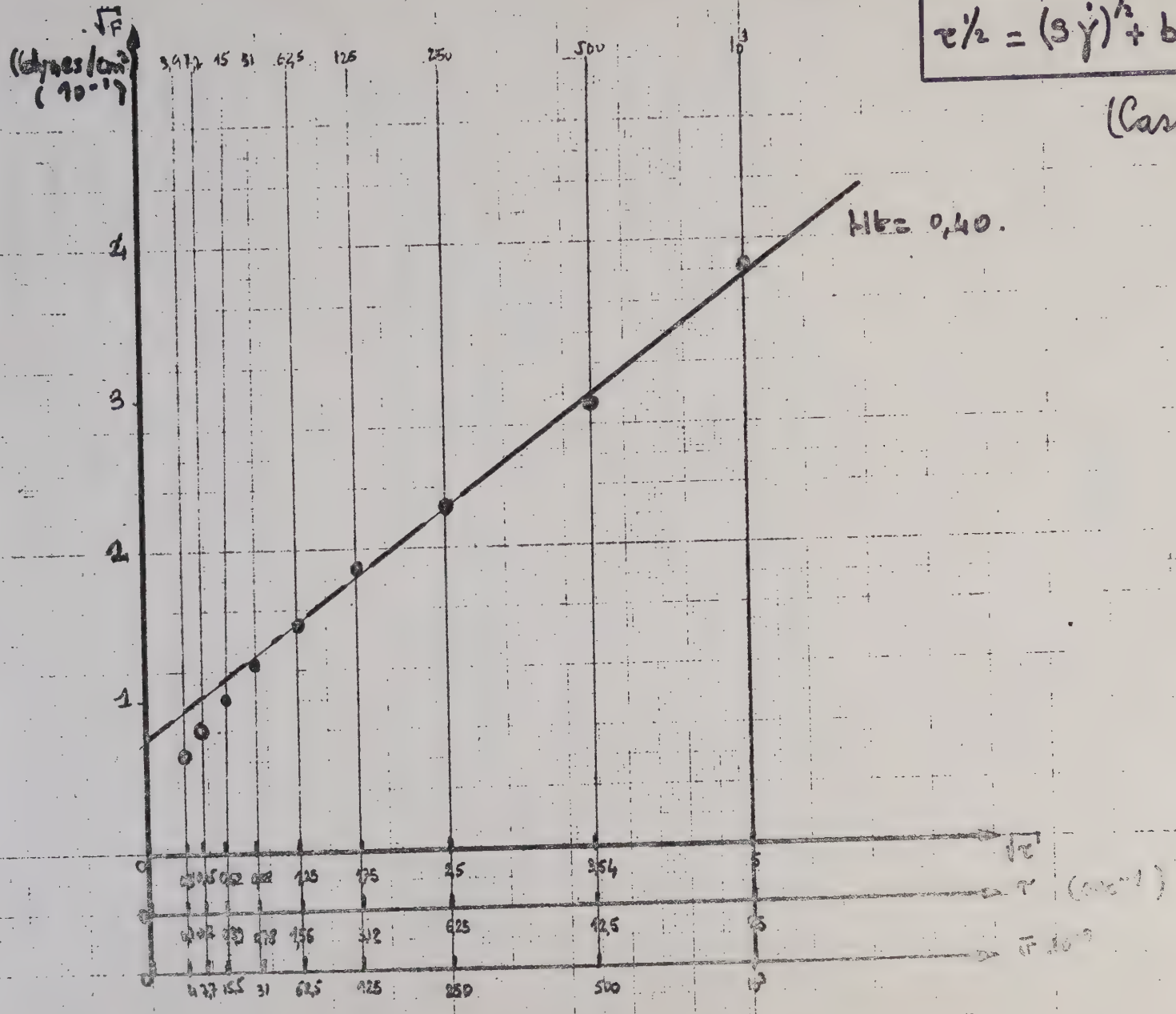


Fig 3b

CONCLUSION

L'étude de la rétrodiffusion de la lumière par la suspension sanguine permet de suivre les cinétiques d'agrégation des globules entre eux et d'en déduire les énergies de liaison interglobulaire. Ces énergies sont normalement très faibles pour les assaciations réversibles des globules:II kT en moyenne,mais des modifications de la composition de la membrane peuvent considérablement augmenter ces valeurs ou les diminuer: ainsi,dans les macroglobulinémies ou par substitution d'une partie du plasma par des hauts polymères,l'énergie d'association peut atteindre20 kT. Inversement,certaines drogues sont capables de diminuer ces énergies d' association et de pratiquement rendre les globules toujours indépendants les uns des autres(salicylate,dextranes de bas poids moléculaire,pénicillibes...)

Les associations réversibles interglobulaires peuvent être considérées comme une floculation de colloides lyophobes:la théorie rendant compte de ces floculations explique bien les données expérimentales obtenues et permet de proposer une valeur de 10^{-15} ergs comme valeur de la constante de Hamaker des globules rouges.Cette constante est directement liée à la composition de la membrane et à son microenvironnement.Sa valeur pour le globule rouge est très faible,mais comparable à celle déjà proposée pour des globules blancs (5.10^{-5})

L'étude des conséquences rhéologiques des associations réversibles entre les globules rouges fait apparaitre que la thixotropie du sang est directement liée à ces associations.Par contre le caractère rhéofluidifiant du sang n'est que partiellement dû aux associations interglobulaires.De plus l'équation de comportement généralement admise n'est plus valable aux très faibles taux de cisaillement pour certains sangs normaux faiblement associés et pour les sangs complètement dissociés,qui présentent successivement un comportement newtonien,puis rhéofluidifiant puis à nouveau newtonien au fur et à mesure que les taux de cisaillement augmentent.

D'une façon générale les associations interglobulaires entrainent donc une augmentation de la viscosité apparente en régime stationnaire d'autant plus grande que les énergies de liaison sont plus fortes et que les taux de cisaillement sont plus faibles.

En l'absence de toute réaction immunologique,le sang apparait donc comme une suspension colloidale capable d'une transformation réversible tout à fait comparable aux transformations sol-gel. Cette transformation est l'expression mécanique de la création de liaisons interglobulaires qui peuvent donc considérablement modifier les conditions d'écoulement du sang au niveau des territoires capillaires.

BIBLIOGRAPHIE

M.JOLY-J.Chim.phys. 59;249;I962

A.DOGNON,P.SUQUET-J.Chim.Phys.IO;8I5;I957

A.DOGNON,J.C HEALY,Y. SIMONOT-Ann.Phys.Bio et Med. 3;55;I969

G.H. JONKER;in Colloid Science;Kruyt;I;90;I95I;Elsevier.

G. SHUSTER-Astrophysical J;I,I905

A.RYDE.Proc.Soc.Roy. London.464,I3I,I93I

NGUEN-NGOC-BICH-Thèse medecine Paris.I96I

A.DOGNON-C.R. Ac.Sc.245;I66;I957

A.DOGNON?P.SUQUET,N.BICH-Path.Bio.7;I757;I959

J.C. HEALY-Thèse Médecine.ParisI969-

8.GOLDSTONE,H.SCHMID-SCHONBEIN,R;WELLS;Microvascular Res.2;I970

D.BOURGOIN;J.Chim. Phys. 60;I963

M.JOLY in symposium in Biorheology,part4;I963;Interscience.

M.JOLY-Biorheology;2;75;I964

M.JOLY-Kolloid Z. I82,I33,I962

M.JOLY-J.Chim.phys.56;897;I959

M.Von SMOLUCHOWSKI;Physik.Z. I7,557;I9I6

M;Von SMOLUCHOWSKI-Z.Physik.Chem.92,I29;I9I8

J.TH.OVERBECK.in Colloid Sc. I;278;I952.20)

VAN DEN TEMPEL in Rheology of Emulsions.I963,Pergamon.

A.WATILLON,A.M. JOSEPH-PETIT Disc. Farad. Soc.;42;I43;I966

R.WURMSER in Progress in Bipphysics,Vol 7,p.88

G.OSTER-in Progress in Biophysics.Vol I,p.73

4)KASTLER.Diffusion de la lumière par les milieux troubles. Herman I952
5)L.PAULING.Disc. Farad Soc.I7O;I5O;I953
6)E.BARBU,M.JOLY;Disc. Farad Soc.I3;77;I953
7)P.J.BLATZ,A.V.TOBOLSKY.J.Phys. Chem.49;77;I945
8BRESLER Disc.Farad Soc.I58,I67,I958
9)COAGULATION AND FLOCULATION Disc. Farad Soc.I8,I954
0)CORKILL.Tras. Farad.Soc.63,53I,I967
1)G.CHAMPETIER in Traité de Chimie Organique XXII,53I,Masson
2)Ed. BAYEUR.J.Ch. phys.84I,47,I95O
3)M.JOLY. Communication personnelle
4)J.E GARWINJ.Exp Med.II4,45I,I96I
35)D.R COMAN.Cancer Res.2I,I946,I96I
6)D.R. COMAN Cancer Res.I5,54I,I955
7)L.WERWICK.Cancer Res.22,982,I962
8)A.S.G CURTIS. The Cell Surface.Academie Press I967
9)L.Weiss.Exp.Cell Res.Suppl.8,I4I
0)L.WEISS.International R.Cytology.9,I87,I96O
1)D.E. BROOKS J. Cell Phys.69;I55;I967
2)M.S STEINBERG?J.Exp.Zool.I57,327,I964
3)COKELET Trans Soc.Rheology.7,303,I963
4)A.S.G CURTIS Biol. Rev.37,82;I962
5)A.S.G. CURTIS American Naturalist,874,37,I96O
6)A.S.G. CURTIS Symp.Zool.Soc. London 25,335,I97O
7)H.SCHMID-SCHONBEINJJ.of Clin. Inv.47,I447,I968
8)D. GINGELL,J.Theor. Biol.30;I2I;I97I
9)B.A PETHICA Exp.Cell Res. Suppl. 8;I23,I96I
0)J.LYKLEMA,Adv.Colloid Sci. 2,65,I968
1)A. DAUPLAN-BRESSOT Thèse Chimie Organique Montpellier I97I
2)T.W HEALY,V.LA MER;J. Colloid SC. I9.323;I964
3)D. SWIFT,S K. FRIEDLANDER,J.Colloid Sc. I9,63I,I964
4)T.TENFORDE,Adv.IN Biol. Physics.I3,43,I97O
5)E.J AMBROSE, Progress in Biophysics. Vol. I6,p. 243
7)A.RAMBOURG.Internat? R. of Cytology,3I,57,I97I
8)A.J. SALSBURY J.A CLARKE Rev. Fr. Et. Clin. et Biol. I2,98I;I967
9)L.GOUGEROT,M.FOUCHER;Ann. phys. Biol et Med.6,I7;I972

80)J.F STIOTZ,C. VIGNERON,A. LARCAN.Biorheology,8,II,I97I
8I)A.LARCAN et Coll.Path. et Biol. I9;303,I97I
82)RED CELL MEMBRANE,Structure and Function.I969;Lippincott C°.
83)J.M PAPENHUIJZEN rheol. Acta.II;73;I972
84)J.D. FERRY .Viscoelastic Properties of Polymers.Wiley ed. I970
85)J.G. OLDROYD.Proc Phys. Soc. B,64,44,I95I
87)M.A NAWAB,S.G.MASON Trans.Farad.Soc. 54,I7I2,I958
88)STOLTZ,F.STREIFF,A.LARCAN,J.Mécanique.9;I55;I970
89)MARTIN E;WOODS,J. of Colloid and Interface Sc.34,9I;I970
89 bis)L.DINTENFASS ,Rheologica Acta 2,I87,I962
70)R.FAHRAEUS;Acta Medica Scandinavica.CLXI,II,I5I,I958
7I)G.R COKELET in Biomechanics:its foundations and Objectives;Fund ed.I972
72)I.KRIEGER, H.ELROD.J. of Applied Physics.24,I34,I953
73)G.V.VINOGRADOV?I.M.BELKIN,J.of Polymer Sc.,3,9I7;I965
74)L.DINTENFASS,Circulation Res. XI,233,I962
75)G.R COKELET Trans. of Soc Rheo. VII,303,I963
76)L.DINTENFASS.Nature,2I9,956,I968
77)A.M.BENIS.Biorheology,4,33,I967
78)M.H KNISELY in Circulation Vol III,Handbook of Physiology.
79)D.N WALDER?Biorheology,6,23,I969
80)B.PERSOZ,Introduction à l'étude de la rhéologie Dunod I960
8I)A.J. DE VRIES,in Rheology of Emulsions,Pergamon Press I963
82)H.LEADERMAN in Rheology tome II Academic Press I958
83)A.S Lodge in Phenomènes de relaxation et de fluage en rhéologie non linéaire C.N.R.S ,XCVIII,Paris I96I
84)J.C HEALY.Proc .I Congreés Intern. Biorhéologie. Lyon I972.
85)J. FEnkel Kinetic theory of liquids.Oxford I946
86)W. KUHN.Z.Phys. Chem. I6I A,I,I932
87)R SKALAK,et Coll:Biorheology,9,67,I972
88) .R KRUYT Colloid Science Elsevier
89)J.HARKNESS.Biorheology 8,I7I,I97I
90)E.W MERRIL Symposium Biorh.I963,IV,I35
9I)A.LARCAN et Coll.Microcirculation et Hémorhéologie Masson I970
92)F.GINGELL Arch. Biochem and Biophysics I53,I93,I972
93)J.N GEORGE J.Cell Physiol.77?5I,I970
94)E.PONDER Hemolysis and related phenomena.Grune etStratton N.Y I97I
95)J.F STOLTZ J. de Mécanique 9,I55,I970
96)A.J SALSBURY ET coll.Rev Fr? Etudes Cliniques et Biologiques XII,98I,I967

97)J.F STOLTZ et Coll Proc,IerCongrès international Biorh. Lyon I972
98)E.W MERRIL Circulation Res.I3,48,I963
99)E.W MERRIL Symposium Biorhéology IV,I35,I963
IOO)L.DINTENFASS Rheologica Acta 2,I87,I962
IOI)D.K KREID et Coll. Biomaterials (à paraître)

ACADÉMIE DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

4, Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3e cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'ETAT

THESE DE : ES SCIENCES PHYSIQUES

NOM : HEALY

Prénoms : Jean Claude

né le 22 Octobre 19 42 à AULNAY/SOUS/BOIS Dépt :

1ère THESE : Etude expérimentale des associations réversibles entre les globules rouges.

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

Président: Mr. DERVICHIAN
GOUGEROT
HOUILLON
JOLY

Vu et Approuvé

PARIS, le 19 Juin 1973

Le Président

de l'Université de PARIS VI

ACADÉMIE DE PARIS
UNIVERSITÉ PARIS VI